

Einfluss des parathormonähnlichen Peptids (PTHrP)
auf den Ca^{2+} aktivierten Kaliumkanal mit großer
Leitfähigkeit und die Calciumhomöostase bei
glatten Muskelzellen (VSMC)

NIKOLAUS FÖRSTER

INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Einfluss des parathormonähnlichen Peptids (PTHrP)
auf den Ca^{2+} aktivierten Kaliumkanal mit großer
Leitfähigkeit und die Calciumhomöostase bei
glatten Muskelzellen (VSMC)**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin im Fachbereich Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Nikolaus Förster

aus Kiel

Gießen 2012

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik I
Abteilung für Kardiologie und Angiologie
der Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Christian Hamm

Gutachter: Prof. Dr. A. Erdogan

Gutachter: Prof. Dr. S. Rohrbach

Tag der Disputation: 06.12.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1 . Einleitung.....	1
1.1 Die Rolle der VSMC in der Pathologie der Arteriosklerose.....	1
1.2 Ionenkanäle in VSMC.....	4
1.2.1 Muskelzelltypen.....	4
1.2.2 Membranpotential und Ionenkanäle.....	5
1.3 PTH und PTHrP.....	7
1.3.1 PTH und PTHrP: Gemeinsamkeiten, Unterschiede und Wirkung.....	7
1.3.2 Die Wirkung von PTHrP im kardiovaskulären System.....	9
1.4 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit - Fragestellung.....	11
2 . Material und Methoden.....	12
2.1 Zellkultur.....	12
2.1.1 Zellidentifikation.....	12
2.1.2 Zellkultivierung.....	13
2.2 Lösungen und Substanzen.....	14
2.3 Messmethoden.....	15
2.3.1 Fura-2-Imaging.....	15
2.3.2 Membran-Potential-Messungen.....	16
2.4 Statistik.....	17
3. Ergebnisse.....	19
3.1 Fura-2AM Imaging – Calciummessungen.....	19
3.1.1 Abhängigkeit der Calciumfreisetzung glatter Muskelzellen vom BK_{Ca} bei Stimulation mit PTHrP.....	19
3.1.2 Einfluss des second messenger Inositol 1,4,5 trisphosphat (IP3) auf die Calciumfreisetzung in der glatten Muskelzelle.....	22
3.1.3 Einfluss der Calciumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums auf die Calciumhomöostase von glatten Muskelzellen.....	27
3.2 Membranpotentialmessungen.....	30
3.2.1 Membranpotentialmessung bei Inhibierung des BK_{Ca} mit Iberiotoxin.....	30
3.2.2 Abhängigkeit der durch PTHrP induzierten Hyperpolarisation des Membranpotentials glatter Muskelzellen von intrazellulärem Calcium.....	32
4 . Diskussion.....	38
4.1 PTHrP und seine Wirkung im menschlichen Organismus.....	38
4.2 Wechselwirkung zwischen dem BK_{Ca} , der intrazellulären Calciumhomöostase und der Membranhyperpolarisation der glatten Muskelzellen unter dem Einfluss von PTHrP.....	39
4.2.1 BK_{Ca} in der glatten Muskelzelle.....	39
4.2.2 Der Calciumchelator BAPTA und die intrazelluläre Calciumhomöostase.....	42
4.2.3 Calciumhomöostase glatter Muskelzellen und deren Beeinflussung durch PTHrP.....	43
4.2.4 Die Freisetzung des Calciums mittels IP3-Rezeptoren.....	45
4.3 Klinische Bedeutung und eine Darstellung der experimentell bestätigten Signalkaskade.....	47

Inhaltverzeichnis

5 . Zusammenfassung	51
6 . Abstract	53
7 . Literaturverzeichnis	55
8 . Abkürzungsverzeichnis.....	68
9. Danksagung	71
10. Erklärung	72

Einleitung

1. Einleitung

Die Unterteilung der Einleitung erfolgt in drei Abschnitte. In 1.1 wird auf die Pathologie der Arteriosklerose und die Rolle der glatten Muskelzellen (VSMC-vascular smooth muscle cell) eingegangen, 1.2 befasst sich mit den Ionenkanälen in den VSMC, unter 1.3 wird das Parathormon ähnliche Peptid (PTHrP) vorgestellt und in 1.4 wird auf die Fragestellung der Arbeit eingegangen.

1.1 Die Rolle der VSMC in der Pathologie der Arteriosklerose

Blutgefäße bestehen im Allgemeinen aus drei verschiedenen Wandschichten. Die Einteilung geschieht wie folgt: Die innerste Schicht besteht aus dem Endothel, einer dünnen Zellschicht, welche die Blutgefäße auskleidet. Die Endothelzellen liegen dabei auf einer feinen Membran aus Bindegewebe, der *Elastica interna*, zusammen bilden diese beiden Strukturen die *Tunica interna* oder *Intima*. Die mittlere Schicht, *Tunica media*, besteht aus elastischen Fasern und glatten Muskelzellen (vascular smooth muscle cell - VSMC). Die Dicke dieser Muskelschicht variiert je nach Gefäßdurchmesser, Lokalisation und Funktion. Die äußere Schicht, *Tunica externa*, wird von Bindegewebe gebildet. Untereinander sind die glatten Muskelzellen durch Desmosomen, also enge scheibenförmige Zellstrukturen in der Zellmembran, verbunden und bilden so ein Netzwerk.

Das Endothel dient dabei nicht nur der Auskleidung, sondern nimmt auch eine wichtige Rolle als Regulator der Gefäße in Anspruch. Es sorgt unter anderem für die Balance zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation, Fibrinolyse und Thrombogenese, sowie dem Gleichgewicht der Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen. Dies

Einleitung

geschieht mit Hilfe von diversen Mediatoren wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO), Derivate der Arachidonsäure, Endothelin, Prostaglandin (PGI₂) und Adenosin-Tri-Phosphat (ATP), welche hierfür von den Endothelzellen synthetisiert werden. Ebenso stellen sie pro- und antithrombotische Substanzen wie Prostacycline, Thrombin, von-Willebrand-Faktor, Heparansulfat, Protein C, Plasminogenaktivatoren und den Plättchen-aktivierenden Faktor her [5-8].

Durch verschiedene Faktoren kann diese Homöostase aus dem Gleichgewicht gebracht werden, so dass das Endothel in einen proinflammatorischen und prothrombotischen Zustand gerät [9]. Dieser Status zeigt sich in einer veränderten Vasoreaktivität mit Einschränkung der endothelabhängigen Relaxation, einer erhöhten Permeabilität der Gefäßwand für Plasmaproteine, einer Hyperadhäsivität für Leukozyten, insbesondere Monozyten und einer Sekretion chemotaktischer Substanzen mit Wirkung auf Leukozyten [1,10]. Dieser Zustand, welcher ohne morphologisches Korrelat einhergeht, wird endotheliale Dysfunktion genannt. Dies ist der Anfang der Arteriosklerose.

Zu den Risikofaktoren der endothelialen Dysfunktion gehören Diabetes mellitus, Übergewicht, Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie und arterielle Hypertonie ebenso, wie auch Rauchen, Stress, das Geschlecht - Männer sind häufiger betroffen - und das Lebensalter, Virusinfektionen und weitere immunologische Prozesse.

Die Pathogenese der Arteriosklerose kann in vier Schweregrade eingeteilt werden. Am Anfang steht die endotheliale Dysfunktion, gefolgt von der inflammatorischen Phase, in welcher es zur Adhäsion von Monozyten mit anschließender Migration in den subintimalen Raum kommt. Dort erfolgt eine Lipidaufnahme der nun zu Makrophagen umgewandelten Zellen und diese werden zu sogenannten Schaumzellen, die sich makroskopisch als sogenannte fatty streaks, also gelblich gelantinöse Fettschichten, darstellen. Es folgt die reparative Phase, in der das Hauptmerkmal die Umwandlung glatter Muskelzellen von einem kontraktilen in einen sekretorischen Zustand ist, was bedeutet, dass die VSMC wie Fibroblasten funktionieren und Kollagen und Glykoproteine sezernieren. Es entsteht über der Lipidablagerung in der Gefäßwand eine fibrinöse Kappe, die Narbengewebe entspricht. Jedoch bildet sich durch diesen „Reparaturvorgang“ ein Blutflusshindernis, welches zu einer erschwerten Ernährung des darunterliegenden Gewebes führt. Die letzte Phase ist das thrombotische Stadium: bei Verletzungen der zuvor gebildeten Narbe kommt es zur Freisetzung

Einleitung

prothrombotischer Substanzen. Durch diese und nun freiliegendes Kollagen erfolgt die Thrombozytenaktivierung mit nachfolgender Bildung eines Thrombus und eventuellem Lumenverschluss des Gefäßes [10].

Proliferation, Syntheseleistung und Migration vaskulärer glatter Muskelzellen (VSMC) haben also in der Pathogenese der Arteriosklerose eine wichtige Rolle [11].

Durch die inflammatorische Umgebung werden die VSMC aktiviert und wandern vermehrt aus der Media in die intimale Läsion ein. Dort erfolgt die weitere Proliferation der Zellen. Dabei ist essentiell, dass sie nicht nur auf Botenstoffe reagieren, sondern diese auch produzieren und sezernieren. So unterstützen sie die Makrophagen und die aktivierten T-Lymphozyten bei der Inangriffnahme des inflammatorischen Prozesses [24]. Des Weiteren bilden die glatten Muskelzellen zusammen mit der extrazellulären Matrix die fibrinöse Kappe, welche das Blut und den eigentlichen Plaque voneinander trennt [25].

Eine weitere wichtige Rolle spielen die VSMC bei der Umwandlung eines stabilen in einen instabilen Plaque. Infolge der verminderten Produktion von extrazellulärer Matrix durch die glatten Muskelzellen kann es zu vermehrtem enzymatischem Abbau kommen, somit büßt der Plaque seine Stabilität ein. Dies kann z.B. durch vermehrte Freisetzung von Interferon alpha durch aktivierte T-Lymphozyten geschehen [26].

So wird deutlich, dass außer den Endothelzellen auch die glatten Muskelzellen wesentlich zum Entstehungsmechanismus der Arteriosklerose, wie zum Beispiel zu der Entwicklung der Plaques, sowie zur Differenzierung zwischen stabiler und instabiler Läsion beitragen.

Die Regulierung der Funktion glatter Muskelzellen ist dabei zu einem großen Anteil von der intrazellulären Calciumkonzentration abhängig. Diese wird über verschiedene Mechanismen gesteuert. Zum einen kann das intrazelluläre Calcium durch Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum erhöht werden. Zum anderen ist auch ein Einstrom von Calcium von extrazellulär möglich. Dies geschieht u.a. durch die spannungsabhängigen L-Typ und T-Typ Calciumkanäle. Diese unterscheiden sich folgendermaßen: Die L-Typ Kanäle (large conductance and long lasting current) besitzen eine große Leitfähigkeit und die gemessenen Ströme sind lang anhaltend und groß. Die Ströme der T-Typ Kanäle (tiny and transient) hingegen sind klein und kurz anhaltend [87].

Endothelzellen hingegen exprimieren diese Kanäle nicht und so erfolgt bei ihnen der

Einleitung

Einstrom von Calcium meist passiv durch nicht selektive Ionenkanäle [36,37].

Der Calciuminflux über die L-Typ Kanäle ist von dem Membranpotential abhängig. Die Aktivität von verschiedenen Ionenkanälen wiederum, welche sich in der Plasmamembran befinden, wie z.B. K^+ und Cl^- Kanäle, regelt das Membranpotential und beeinflusst so die VSMC Aktivität und den Calciumeinstrom. Durch eine vermehrte Öffnungswahrscheinlichkeit des Calcium abhängigen Kaliumkanals (BK_{Ca}) kommt es dabei zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran und letztenendes zur Regulierung des Gefäßtonus [38]. So kann als Schlussfolgerung angenommen werden, dass die intrazelluläre Calciumkonzentration über die Aktivität von Ionenkanälen gesteuert wird und somit calciumabhängige Signaltransduktionswege indirekt von Ionenkanälen reguliert werden [39].

1.2 Ionenkanäle in VSMC

1.2.1 Muskelzelltypen

Die Kontrolle der Ionenverteilung zwischen dem Zellinneren und der Umgebung ist eine Grundvoraussetzung für die reguläre Zellfunktion. In jedem komplexen Organismus werden daher Transportmechanismen für Ionen benötigt. Diese Aufgabe wird u.a. von Ionenkanälen übernommen, die mit hoher Effizienz Kationenflux und Anionenflux entlang von Konzentrations- oder Elektrogradienten durch die Zellmembran vermitteln. Elektrische Effekte, die durch die Aktivität von Ionenkanälen generiert werden, sind z.B. an der Erhaltung des Ruhemembranpotentials, der Nervensignalfortleitung und auch an Kontraktionsprozessen beteiligt [15].

Bei den glatten Muskelzellen unterscheidet man generell zwei Typen. Den single-unit Typ und den multi-unit Typ. Die Differenz zwischen den beiden liegt dabei in ihrer Verknüpfung und Erregbarkeit untereinander.

Single-unit Typ: Dieser Typus bildet durch gap-junctions elektrisch gekoppelte Zellverbände. Über die Verbindung erfolgt ein Austausch von Second-Messenger Molekülen und Ionen. Dadurch ist eine schnelle Ausbreitung der Erregung

Einleitung

gewährleistet, was eine beinahe zeitgleiche Kontraktion der Zellen erlaubt. Den Anstoß der Zellerregung geben dabei nicht nervale Strukturen, sondern sogenannte Schrittmacherzellen. Eine Beeinflussung ist jedoch durch das vegetative Nervensystem möglich, wie z.B. im Darm.

Multi-unit Typ: Anders als beim Single-unit Typ gibt es innerhalb des Zellverbandes keine Kontraktion der Nachbarzellen. Jede einzelne glatte Muskelzelle wird durch eine Nervenfasern des vegetativen Nervensystems innerviert. Dieses ist der vorherrschende Typ des Gefäßsystems [17].

Eine weitere Verknüpfung durch elektrische Signale besteht zwischen den glatten Muskelzellen und Endothelzellen. Diese Verbindung ermöglicht ebenfalls eine Beeinflussung der Kontraktilität [16].

1.2.2 Membranpotential und Ionenkanäle

Das Membranpotential der glatten Muskelzellen liegt bei -40mV bis -60mV und wird durch die Kaliumkanäle der Zelle aufrechterhalten. Eine Hyperpolarisation der VSMC wird durch eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der calciumabhängigen Kaliumkanäle (BK_{Ca}) erreicht. Durch die hierdurch hervorgerufene Schließung von Calciumkanälen kommt es zu einer verminderten intrazellulären Calciumkonzentration und infolgedessen zu einer Vasodilatation. Durch die Depolarisation der Zellmembran, hervorgerufen durch eine verminderte Kaliumkanalöffnung, wird hingegen ein erhöhter Calciumeinstrom und somit eine Vasokonstriktion erreicht [17, 38]. Erhöht sich die intrazelluläre Calciumkonzentration in Endothelzellen hingegen, kommt es zu einer Vasodilatation in den angrenzenden glatten Muskelzellen [38].

Es können u.a. vier Typen von Kaliumkanälen in glatten Muskelzellen unterschieden werden [20].

- Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_V): Sie sind ein wichtiger Regulator des Membranpotentials der glatten Muskelzelle und erhöhen ihre Aktivität bei depolarisierenden Reizen.
- Einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (KIR): Sie dienen der Stabilisierung des Membranpotentials. Eine Aktivierung des KIR bewirkt eine Hyperpolarisation der Zellmembran.

Einleitung

- ATP abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP}): Sie sind unter physiologischen Bedingungen geschlossen und öffnen sich erst bei einer Verminderung der intrazellulären ATP-Konzentration. Dies kommt z.B. bei einer Energieverarmung der Zelle vor und führt zu einer anschliessenden Membranhypervolarisation.
- Calcium aktivierte Kaliumkanäle (KCa): Da dieser Kanal im Mittelpunkt dieser Untersuchung steht, wird er im weiteren Verlauf detaillierter besprochen.

Die Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle (KCa) lassen sich aufgrund ihrer Leitfähigkeit in drei Typen einteilen: Kaliumkanäle mit geringer Leitfähigkeit („small conductance“ - $SKCa$; Leitfähigkeit 10-14 pS), mit mittlerer Leitfähigkeit („intermediate conductance“ - $IKCa$; Leitfähigkeit 30-80 pS) und mit großer Leitfähigkeit („big conductance“ - $BKCa$; Leitfähigkeit 100-250 pS) [19]. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Calcium aktivierten Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit ($BKCa$). Der $BKCa$ ist ein Kanal, dessen Aktivität zum einen vom Membranpotential und zum anderen von der Ca^{2+} - Homöostase abhängig ist. Die Regulation der Kanalaktivität durch die Calciumhomöostase erfolgt über eine aus vier Segmenten bestehende Bindungsstelle an der zytoplasmatischen Seite des Proteins. Diese Bindungsstelle wird „Calcium bowl“ genannt. Kommt es nun zu einer vermehrten Bindung von Ca^{2+} an die „Calcium-bowl“, erhöht sich dadurch die Öffnungswahrscheinlichkeit für den $BKCa$ [77]. Da der $BKCa$ eine große Leitfähigkeit und gleichzeitig eine hohe Selektivität für K^+ Ionen besitzt, kommt es infolgedessen zu einem starken Kaliumausstrom aus der Zelle, welcher eine Hypervolarisation der Zellmembran hervorruft [76]. Diese wiederum ruft eine verminderte intrazelluläre Calciumkonzentration hervor. Während eine Depolarisation, ausgelöst beispielsweise durch einen erhöhten intravaskulären Druck, eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration hervorruft und somit zu einer reflektorischen Vasokonstriktion führt, kommt es bei einer Hypervolarisation somit zu einer Vasodilatation [38]. Das heißt, dass über eine Beeinflussung des Ionenkanals ($BKCa$) calciumabhängige Stoffwechselwege verändert werden können. So wurde z.B. von Nelson et al. gezeigt, dass der $BKCa$ an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt ist [20]. Die Identifikation des $BKCa$ kann mit Iberiotoxin erfolgen, da es sich bei diesem Skorpiongift um einen hochselektiven Blocker des $BKCa$ handelt [21,22]. Eine weitere Möglichkeit zur Blockade des $BKCa$ besteht in der Applikation von Tetraethylammonium (TEA) und Charybdotoxin (CTX). Diese beiden Ionenkanalblocker sind jedoch nicht spezifisch [23].

Einleitung

1.3 PTH und PTHrP

1.3.1 PTH und PTHrP: Gemeinsamkeiten, Unterschiede und Wirkung

Bei dem Parathormon (PTH) handelt es sich um ein einkettiges Peptidhormon, welches von der Nebenschilddrüse produziert und sezerniert wird. Die Ausschüttung erfolgt pulsatil und in circadianer Rhythmik. PTH und das Vitamin D3 sowie der Gegenspieler Calcitonin aus den C-Zellen der Glandula parathyroidea regulieren dabei die Serumkonzentration des ionisierten Calciums des Organismus durch direkte Wirkung am Knochen und an den Nieren.

Hauptfunktion des Parathormons ist dabei die Erhöhung der Calciumkonzentration im Blut. So wird auch die Sekretion des PTH über die Calciumkonzentration im Blut reguliert – bei einem Anstieg des Serumcalciums wird die Sekretion gehemmt. Die Wirkung des Parathormons erfolgt über die vermehrte Reifung und Aktivierung der Osteoklasten. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Calcium und Phosphat aus dem Knochen. Gleichzeitig hemmt PTH noch die Phosphat-Rückresorption in der Niere und erhöht dabei die Calciumresorption im distalen Tubulus.

Bei Gesunden ist die PTH-Sekretion primär abhängig von der Konzentration des ionisierten Calciums aber auch von der Phosphatkonzentration. Die Halbwertszeit des intakten Parathormons beträgt dabei in vivo ca. 3-5 Minuten [72,73].

Das Parathormon ähnliche Peptid (PTHrP) wurde erstmalig 1987 in einer menschlichen Lungentumor-Zelllinie nachgewiesen. Damals wurde es als Protein mit PTH ähnlichen Effekten beschrieben [30]. Es war das Ergebnis einer langen Suche nach dem Faktor, der für das Bild der malignen neoplastischen Hypercalciämie verantwortlich ist. Dabei bilden die Zellen des malignen Gewebes ein dem Parathormon ähnliches Protein – das PTHrP – welches ebenso wirkt.

Bei der genaueren Untersuchung der beiden Proteine PTH und PTHrP zeigt sich eine signifikante Homologie innerhalb der ersten 13 Aminosäurereste des N-terminalen

Einleitung

Abschnittes. Die nachfolgenden Aminosäuresequenzen besitzen kaum Übereinstimmungen, lediglich drei Aminosäurereste sind noch identisch. Jedoch genügt dem PTHrP die signifikante Homologie der ersten 13 Aminosäuren zur Imitation diverser Wirkungen des Parathormons [74]. Die so ausgelösten PTH-ähnlichen Effekte werden über den PTH1-Rezeptor vermittelt, an den beide Hormone binden können und so dessen Aktivierung einleiten. Der PTH1-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor [75].

Das Parathormon ähnliche Peptid (PTHrP) ist ein vasodilatatorisch wirksames Protein, welches nicht nur von Tumorzellen in die Blutbahn gegeben, sondern auch von diversen Zellen des kardiovaskulären Systems sezerniert wird, um zusammen mit dem PTH/PTHrP Rezeptor oder PTH-1 Rezeptor (PTH1R) seine Wirkung zu entfalten. Haut, Knochenmark, Hypothalamus und das zentrale Nervensystem exprimieren es ebenfalls. Karpalis et al. fanden des weiteren heraus, dass PTHrP auch für die normale Skelettentwicklung eine große Bedeutung hat. Erstens spielt es eine große Rolle bei der Proliferation der Chondrozyten. Ein Fehlen von PTHrP hatte in den durchgeführten Versuchen eine Reduktion der Größe der Wachstumsplatte von langen Knochen zur Folge. Zum Zweiten haben Karpalis et al. herausgefunden, dass es durch das Fehlen von PTHrP zu einer vorzeitigen Zelldifferenzierung der Chondrozyten kommt [71]. Dieser Prozess resultiert aus einer reduzierten Anzahl von proliferierenden Chondrozyten, frühzeitiger Hypertrophie und anschließendem Untergang der Chondrozyten, was wiederum zu frühzeitiger Knochenausbildung führt.

So wirkt PTHrP als lokaler Mediator bei der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und dem Zelltod [12,13]. Die vermehrte Expression von PTHrP kann dabei durch vasokonstriktorisch aktive Substanzen gefördert werden, ebenso wie durch Wachstumsfaktoren [12]. Ebenfalls wird eine Freisetzung durch pathologische Stimuli, wie Arteriosklerose, Bluthochdruck und Restenosierung nach Angioplastien gesteigert [14]. Auch vermehrte Dehnung, die bei ständigen hämodynamischen Kräften wie dem pulsatilen Blutdruck entsteht, kann zu einer vermehrten Freisetzung des Parathormon ähnlichen Peptids führen [31,32], was wiederum die Zellproliferation der vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) fördert [33].

Aufgrund dieser Vielseitigkeit des Parathormon ähnlichen Peptids wird das Hormon von Massfelder et al. nicht nur als ein dem PTH ähnliches Peptid gesehen, sondern es wird vielmehr mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie dem Transforming Growth Factor-alpha (TGF-alpha) und dem Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) verglichen [40].

Einleitung

1.3.2 Die Wirkung von PTHrP im kardiovaskulären System

Wie bereits erwähnt, ist PTHrP in der Lage, diverse Funktionen des PTH zu imitieren. So wird das kardiovaskuläre System durch das Parathormon beeinflusst. Dort kommt es unter dem Einfluss von PTH zu einer Vasodilatation der Gefäße. Dieser relaxierende Effekt sorgt im Folgenden für eine Hypotension, dem Absinken des systemischen Blutdruckes [66]. Diese Wirkung ist jedoch in vivo nicht nachvollziehbar, da die Konzentration des im Blut zirkulierenden PTH zu gering ist.

PTHrP hingegen wirkt schon in wesentlich geringeren Konzentrationen vasorelaxierend. Diesen vasodilatatorischen Effekt haben Nickols et al. an isoliert perfundierten Herzen 1989 zeigen können [67].

Die Frage nach dem Ort der Expression von PTHrP klären Burton et al. Sie zeigen in ihrer Arbeit, dass das Peptidhormon sowohl in Gefäßen als auch im Herzen ausgeschüttet wird. Die höchsten Konzentrationen werden in kardialen Gefäßen und im Myokard der Vorhöfe gefunden [79]. Im Ventrikelmuskel hingegen findet bei Erwachsenen keine Freisetzung von PTHrP statt [80].

Als Zielzellen für PTHrP im kardiovaskulären System können verschiedene Zelltypen fungieren:

1. die Herzschrittmacherzellen
2. die Kardiomyozyten
3. die glatten Muskelzellen der Gefäße

Rian et al. fanden zusätzlich heraus, dass PTHrP zwar von mikrovaskulären Endothelzellen im Herzen exprimiert wird, diese aber aufgrund des Mangels an Rezeptoren selber nicht auf das Hormon reagieren [78].

Die Expression von PTHrP wird auf verschiedenen Wegen reguliert. Zum einen kann durch mechanische Stimulation mittels Ballondilatation der Rattenaorta eine vermehrte Freisetzung des Peptids nachgewiesen werden [81]. Zum anderen können auch Modulatoren wie das Angiotensin II, Noradrenalin, Serotonin, Bradykinin und Thrombin zu einer vermehrten Expression führen [82].

Die durch die Ballondilatation ausgelöste Dehnung und folgende PTHrP Ausschüttung

Einleitung

wiederum hat eine vermehrte Zellproliferation der VSMC zur Folge [33].

Eine Arbeitsgruppe um Hongo et al. hat hingegen herausgefunden, dass PTHrP die Proliferation der vaskulären Gefäßmuskelzellen verhindert. Die N-terminalen Fragmente des Peptids sollen demnach die Serum- und die PDGF (Platelet-derived growth factor)-abhängige DNA-Synthese in primären Kulturen von VSMC senken können [68]. Vermittelt werden diese antiproliferativen Effekte über den PTH1-Rezeptor. Das würde bedeuten, dass PTHrP eher einen protektiven Effekt in Hinblick auf arteriosklerotische Veränderungen hat. Gestützt wird diese Theorie dabei von Ishikawa et al., die herausgefunden haben, dass PTHrP die PDGF-induzierte Migration von glatten Muskelzellen hemmt.

Ob PTHrP nun pro- oder antiproliferativ wirkt, ist also nicht eindeutig bewiesen, jedoch gilt als gesichert, dass PTHrP bei kardiovaskulären Erkrankungen, wie der Arteriosklerose, eine wichtige Rolle spielt. So konnten Ozeki et al. die vermehrte Expression von PTHrP bei Restenosierungen nach Angioplastie nachweisen und erhoben so die Hypothese, dass PTHrP eine wichtige Rolle als Regulator von der Proliferation glatter Muskelzellen zukommt [69].

Beide Peptide besitzen eine direkte Wirkung auf das Herz. So führt bei in vivo Experimenten die vermehrte Expression sowohl von PTH als auch von PTHrP zu einem positiv chronotropen Effekt [28]. Das Parathormon ähnliche Peptid hat zusätzlich auch noch einen positiv inotropen Effekt, welcher zum einen an isolierten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte und zum anderen auch bei dem isoliert perfundierten Rattenherz beobachtet werden kann [80,44,67].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass verschiedene in-vitro und in-vivo Experimente zeigen, dass das Parathormon ähnliche Peptid eine wichtige Rolle bei kardiovaskulären Prozessen einnimmt.

Einleitung

1.4 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit - Fragestellung

Ziel der Arbeit war, den Einfluss des Parathormon ähnlichen Peptids (PTHrP) auf den Ca^{2+} aktivierten K^+ Kanal mit großer Leitfähigkeit bei glatten Muskelzellen (VSMC) aufzuzeigen. Desweiteren wurde dabei die Abhängigkeit von Calcium untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Für alle Versuche werden aus der Rattenaorta stammende glatte Muskelzellen (VSMC) (Lonza Group Ltd, Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, Schweiz) verwendet [89]. Die Primärkulturen der VSMC werden aus der Aorta von Sprague Dawley Ratten mit einem Gewicht von 150-200 g gewonnen.

Lonza Group Ltd. garantiert hierbei die ethischen und gesetzlichen Standards einzuhalten (www.lonza.com).

Die Identifizierung und Kultivierung der Zellen wird in den Abschnitten 2.1.1 und 2.1.2 erläutert.

2.1.1 Zellidentifikation

Die Identifikation der Zellen als VSMC erfolgt durch lichtmikroskopische Beurteilung der Morphologie der Zellen. Dabei wird ein besonderer Wert auf den Ausschluss einer Kontamination der VSMC mit Endothelzellen oder Fibroblasten gelegt. Typischerweise ist die schlanke und spindelförmige Gestalt der glatten, nicht kontrahierten Muskelzellen zu erkennen, sowie die fehlende Querstreifung, welche die Differenzierung zu quergestreifter Skelettmuskulatur erlaubt. Nach einigen Subkultivierungen können die glatten Muskelzellen an Grösse und Zellvolumen zunehmen und stellen sich eventuell als kantige Zellen dar. Klassisch im Lichtmikroskop ist auch die „Berg und Tal“-Struktur des Zellrasens nach Erreichen der Konfluenz. Dieses Phänomen wird durch die Anordnung der Zellen in Form von Multilayern mit Inseln von Monolayern erwirkt.

Mit höherem in vitro-Alter dominieren schließlich die Monolayer-Areale. Erfolgt keine weitere Passagierung, werden die Zellen postkonfluent. Das zeigt sich durch Zellknoten in Gebieten mit sehr hoher Zelldichte. Diese Knoten bestehen aus alten Zellablagerungen, welche von vitalen VSMC umgeben sind.

Material und Methoden

2.1.2 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zellen wird in einem Brutschrank bei 37°C mit einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO₂ Anteil von 5% durchgeführt. Sobald die VSMC zu einem Zellrasen gewachsen sind, werden die Zellen der Primärkultur in 25 cm² Plastikkulturflaschen (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Als Nährmedium wird Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) verwendet. Zusätzlich wird das Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10 % fetalem Kälberserum (FCS) versetzt. Jeweils drei Mal wöchentlich wird das Nährmedium gewechselt und bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens erfolgt eine neue Passagierung der Zellen. Dazu wird das Nährmedium aus der zu passagierenden Plastikkulturflasche abgesaugt und anschließend die Zellen 3 mal mit HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) gespült. Daraufhin erfolgt die Lösung der VSMC durch eine 6-8 minütige Inkubation im Brutschrank mit Trypsin-EDTA Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Die dadurch hervorgerufene Abkuglung und somit die Ablösung der Zellen wird lichtmikroskopisch kontrolliert und es erfolgt die Unterbrechung des Vorganges mit Hilfe von 2 ml FCS. Nach mehrfacher Resuspendierung zum Erlangen einer homogenen Lösung kann ein Teil abpipettiert und die Zellen in neuen Kulturflaschen ausgesät werden. Dieses Verfahren wird maximal bis zur 6. Passage durchgeführt.

3Täglich wird die Zelldichte und Zellmorphologie mit Hilfe des Lichtmikroskops untersucht. Bei Anzeichen oder dem Verdacht auf eine bakterielle Verunreinigung werden die betroffenen Kulturflaschen verworfen. So kann auch einer Kontamination weiterer Kulturflaschen vorgebeugt werden. Die für die jeweiligen Versuche spezifische Aussaat in die speziellen Behältnisse wird in den entsprechenden Kapiteln gesondert besprochen.

Material und Methoden

2.2 Lösungen und Substanzen

Die folgende Lösungen werden in den einzelnen Versuchen verwendet. Falls nicht anders angegeben, erfolgt die Lösung der Substanzen in Aqua bidest.

Badlösung:

Substanz	Endkonzentration in mmol/l
NaCl	140
D-Glucose	5,5
Hepes	10
KCl	5
MgCl	0,5
CaCl	1,5

PH 7,3 (justiert durch die Zugabe von NaOH)

Nährmedium der glatten Muskelzellen:

DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s medium; PAA, Linz, Österreich
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum); PAA, Linz, Österreich

Fluoreszenzfarbstoffe:

DiBAC	bis-(1,3-dibarbituric acid) trimethine oxanol; Molecular Probe, Leiden, Niederlande
-------	---

Material und Methoden

Fura-2-AM	Fura-2-acetoxymethylester; Molecular Probes, Leiden, The Niederlande
-----------	--

Stimulationssubstanzen und Inhibitoren:

PTHrP	parathyroid hormone-related peptide (parathormon ähnliches Peptid); Bachem Biomedica GmbH, Heidelberg, Deutschland
IBX	Iberiotoxin; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Xestospongin C	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Xestospongin D	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Thapsigargin	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid; Calbiochem, Bad Soden, Deutschland

Weitere Substanzen:

HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; PAA, Linz, Österreich
RPMI-Medium	Hydrogencarbonatpuffer/Zellkulturmedium; PAA, Linz, Österreich
HBSS	Medium Hanks' Balanced Salt Solution
PBS	phosphat buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)

2.3 Messmethoden

2.3.1 Fura-2-Imaging

Die Calciummessungen werden per Fura-2-AM imaging durchgeführt. Hierzu werden die glatten Muskelzellen auf Glasplättchen, sogenannten Coverslips, ausgesät und auf diesen für 3-4 Tage in komplettem Nährmedium bei 37°C, bis sie einen konfluenten Zellrasen ergeben, kultiviert. Zur Messung selber erfolgt die „Beladung“ der VSMC mit 1 ml RPMI-Medium (PAA, Linz, Österreich) und fura-2-acetoxymethylester (AM) ($2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) für 60 Minuten. Anschließend wird der Coverslip aus der Petrischale entnommen und in die Messkammer des Mikroskopes eingesetzt. Als Messkammermedium dient die Badlösung. Die

Material und Methoden

Messungen des freien Calciums erfolgt unter einem Fluoreszenzmikroskop (IX 70, Olympus; Hamburg, Deutschland) und die Datenerfassung und Auswertung mit der TILL Photonics Imaging System Software (Till Photonics, Martinsried, Deutschland). FURA-2 bildet zusammen mit Ca^{2+} einen Komplex, der bei einer Wellenlänge von 340 und 380 nm zur Fluoreszenz angeregt wird. Diese Fluoreszenz wird bei einer Wellenlänge von 510 nm gemessen. Die Messungen werden mit verschiedenen Stimulationslösungen durchgeführt. Dabei ergeben sich folgende Gruppen:

- Kontrollgruppen ohne Stimulation
- PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Zugabe beim 20. Loop)
- PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) plus Iberiotoxin (100 nmol L^{-1} , Inhibitor des BK_{Ca})
- PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) plus Xestospongin C ($3 \mu\text{mol L}^{-1}$, ein Inhibitor der IP_3 -vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung)
- PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) plus Xestospongin D ($6 \mu\text{mol L}^{-1}$, ein Inhibitor der IP_3 -vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung)
- PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) plus Thapsigargin ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$, ein Hemmstoff der Calciumpumpe des endo-/sarkoplasmatischen Retikulums)
- Iberiotoxin (100 nmol L^{-1})
- Xestospongin C ($3 \mu\text{mol L}^{-1}$)
- Xestospongin D ($6 \mu\text{mol L}^{-1}$)
- Thapsigargin ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$)

Die Inhibitoren werden direkt vor Beginn des Experimentes hinzugefügt. Die Messungen erfolgt alle 6 Sekunden, was einem Loop entspricht. Das gesamte Experiment läuft über 350 Loops, also 35 Minuten.

2.3.2 Membran-Potential-Messungen

Die Untersuchungen des Membranpotentials wird mithilfe des Fluoreszenz Farbstoffes DiBAC (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) durchgeführt. Dafür werden glatte Muskelzellen auf 24-well-Platten (Becton, Dickinson, USA) ausgesät. Diese Platten werden für die folgenden 2-4 Tage in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, PAA, Linz, Österreich) kultiviert. Zur Messung erfolgt die Inkubation der Zellen für 15 Minuten mit dem Farbstoff DiBAC ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) in 250 ml Badlösung bei einer Temperatur von 37°C und unter Lichtausschluss. Anschließend wird das Medium durch DiBAC ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) in 250 ml Badlösung und dem Zusatz von folgenden

Material und Methoden

Chemikalien ersetzt: PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) + BAPTA ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$, Ca^{2+} chelator), PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) + Iberiotoxin (100 nmol L^{-1}), PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) + Xestospongin D ($6 \mu\text{mol L}^{-1}$), BAPTA ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$), Iberiotoxin (100 nmol L^{-1}), Xestospongin D ($6 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten nun mit Hilfe eines GENios plate reader (Tecan, Wien, Österreich), welcher ebenfalls eine interne Temperatur von 37°C gewährleistet und so die Messtemperatur den Kultivierungsbedingungen entspricht. Die Fluoreszenz wird mit 485 nm angeregt und die Emissionen bei 535 nm ermittelt. Messungen erfolgen dabei alle 30 Sekunden und dieses über insgesamt 31 Durchgänge. Die so erhobenen Daten werden während des Messvorganges durch die MAGELLAN Computer Software (Tecan, Wien, Österreich) gespeichert und analysiert.

2.4 Statistik

Die erhobenen Daten zeigen jeweils die Mittelwerte aus mehreren Messreihen, die mit verschiedenen Zellpräparationen durchgeführt wurden. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha=0,05$ gewählt. Der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) ist jeweils angegeben.

Da bei den meisten Testverfahren vorausgesetzt wird, dass die Daten normalverteilt sind, wird diese Voraussetzung als Erste mit dem von Lilliefors modifizierten Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft.

Je nachdem, ob die Hypothese der Normalverteilung der Daten angenommen wird oder nicht, können parametrische Tests oder nicht-parametrische (Rang-) Tests durchgeführt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten metrischen Variablen sind normalverteilt. Es kommen ergo parametrische Verfahren zum Testen von Hypothesen zur Verwendung.

Testentscheidungen mit p-Werten zwischen $0,05$ und $0,01$ werden als signifikant bezeichnet, Werte kleiner als $0,01$ als hochsignifikant.

Da in dieser Arbeit eine Messwiederholungsanalyse durchgeführt wurde (d.h. zeitlich abhängige Messungen am gleichen Individuum) wurde eine multivariate

Material und Methoden

Varianzanalyse mit Messwiederholungen durchgeführt.

Mit dieser Analyse können mehrere Hypothesen getestet werden:

1. Gruppenanalyse: Gleichheit der Gruppenmittelwerte über die Zeit (keine Veränderung im Zeitverlauf)
2. Profilanalyse: Gleichheit der Differenzen zwischen den Gruppenmittelwerten zu den Zeitpunkten (Parallelität der Profile).

Zusätzlich wurden noch – bei Signifikanzen zwischen den Gruppen - zu jedem Zeitpunkt Mittelwertsunterschiede mit Hilfe des F-Tests der Varianzanalyse überprüft. Dazu wurden die p-Werte nach Bonferroni adjustiert [83-85, 88].

Ergebnisse

3. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden nun die Ergebnisse der zuvor beschriebenen Messmethoden aufgezeigt. In Kapitel 3.1 werden zuerst die Resultate der Calciummessungen dargestellt, anschließend werden in Kapitel 3.2 die Daten der Membranpotentialmessungen dargelegt.

Da der maximale Anstieg der Calciummessungen mit dem 150 Loop erreicht wurde, werden nur die ersten 155 Zeiteinheiten dargestellt. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse ist sowohl bei den Calciummessungen als auch bei den Membranpotentialmessungen der 15 Minuten Zeitpunkt (Messpeak) als Blockdiagramm abgebildet (150 Loops entsprechen 15 Minuten).

3.1 Fura-2AM Imaging – Calciummessungen

3.1.1 Abhängigkeit der Calciumfreisetzung glatter Muskelzellen vom BK_{Ca} bei Stimulation mit PTHrP

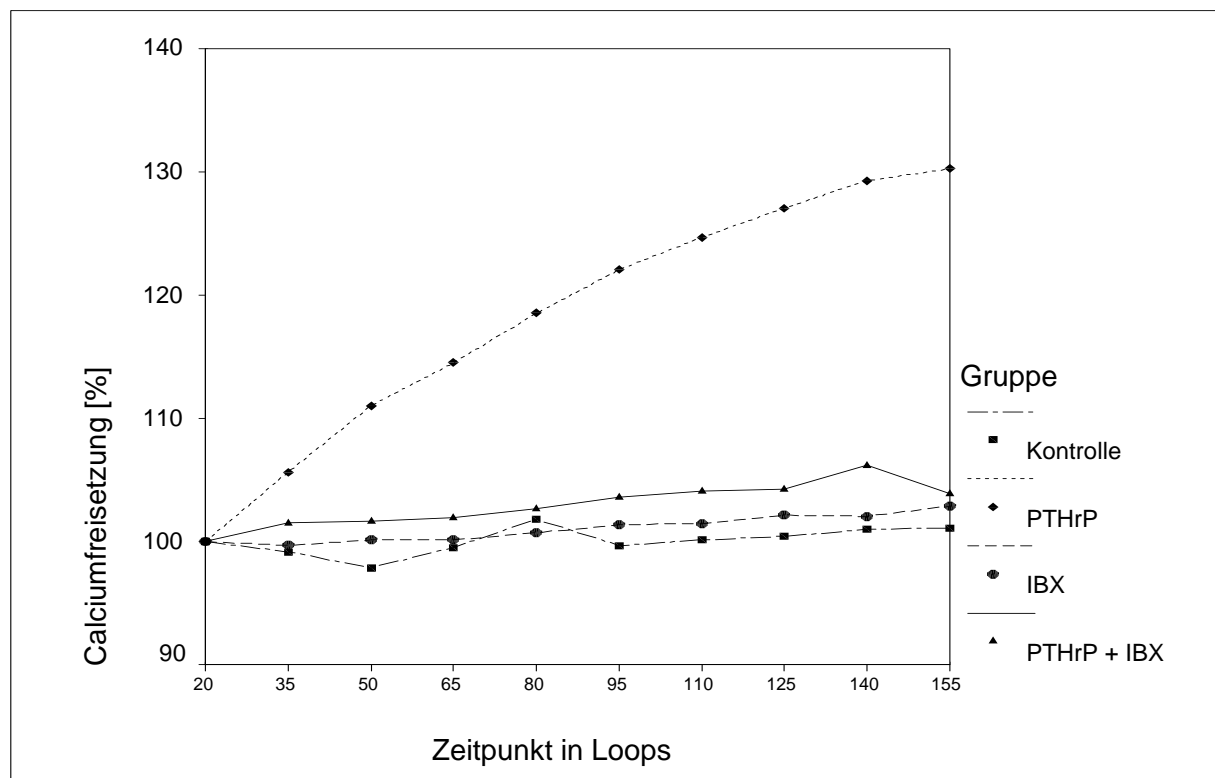
Bei einer Aktivierung des BK_{Ca} kommt es in der Regel zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran glatter Muskelzellen. So ergibt sich die Möglichkeit, dass ein Ca^{2+} -Anstieg in der Zelle resultiert, freigesetzt aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Um die intrazelluläre Calcium-Homöostase und deren Beeinflussung durch PTHrP in Abhängigkeit vom BK_{Ca} zu untersuchen, wird der BK_{Ca} während der Messung der intrazellulären Calciumkonzentration mit dem hochselektiven Inhibitor des BK_{Ca} , Iberiotoxin, blockiert.

Ergebnisse

Tabelle 1: Mittelwerte, Standardabweichungen und Fallzahlen (n) (MW \pm SD)

Zeitpunkt (in Loops)	Kontrolle (n=68)	PTHrP (n=103)	IBX (n=53)	PTHrP+IBX (n=60)
20	100	100	100	100
35	99,17 \pm 6,51	105,63 \pm 9,14	99,68 \pm 2,42	101,51 \pm 2,55
50	97,87 \pm 10,16	111,03 \pm 16,23	100,11 \pm 3,05	101,65 \pm 2,74
65	99,52 \pm 10,97	114,51 \pm 18,74	100,12 \pm 4,43	101,97 \pm 3,54
80	101,82 \pm 13,15	118,53 \pm 19,64	100,71 \pm 5,02	102,65 \pm 4,25
95	99,67 \pm 11,68	122,07 \pm 20,01	101,36 \pm 5,70	103,58 \pm 4,85
110	100,13 \pm 12,14	124,70 \pm 19,62	101,46 \pm 5,56	104,12 \pm 5,02
125	100,43 \pm 11,52	127,08 \pm 18,63	102,13 \pm 5,28	104,22 \pm 5,02
140	100,98 \pm 11,36	129,30 \pm 17,40	102,03 \pm 5,46	106,16 \pm 8,79
155	101,11 \pm 11,45	130,26 \pm 16,13	102,88 \pm 5,56	103,90 \pm 5,33

Abbildung 1:



Ergebnisse

Abbildung 2:

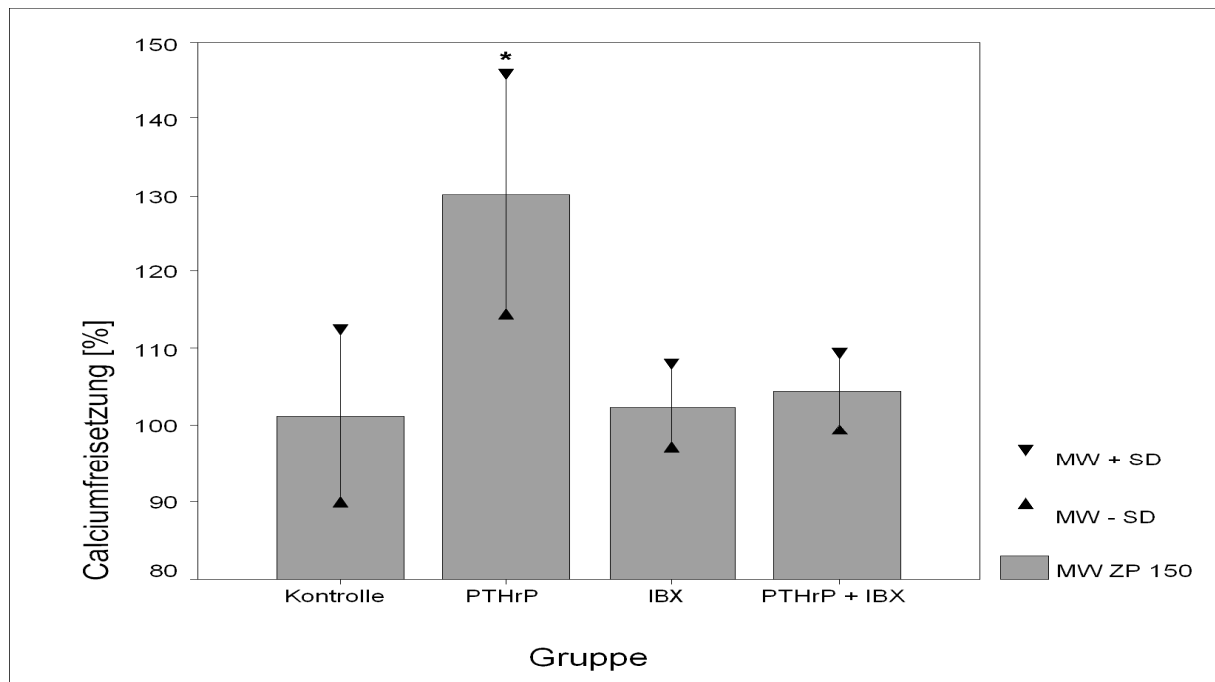


Abbildung 1 und 2: Abhängigkeit der Calciumfreisetzung glatter Muskelzellen vom BK_{Ca} bei Stimulation mit PTHrP und Inhibition mit IBX (MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, ZP=Zeitpunkt in Loops)

* Wert der Gruppe PTHrP signifikant unterschiedlich zu allen anderen drei Gruppen.

Ergebnisse der Messwiederholungsanalyse:

Es zeigen sich im Zeitverlauf signifikante Unterschiede zwischen der Messreihe mit PTHrP und den anderen drei Gruppen (Kontrolle, IBX und PTHrP + IBX).

Der p-Wert liegt dabei jeweils $p < 0,0005$. Diese signifikanten Differenzen können ab dem 35. Loop und zu allen folgenden Zeitpunkten mit einem p-Wert von jeweils $< 0,0005$ dokumentiert werden. Die Messwerte der Calciumfreisetzung nach Stimulation der Zellen mit PTHrP steigen kontinuierlich signifikant an ($p < 0,0005$). Ausnahmen stellen die letzten beiden Zeitpunkte beim 140. und 155. Loop dar; der p-Wert liegt in diesen Fällen bei 0,128. Bei einem Vergleich der Kontrollgruppe, IBX-Gruppe und der simultanen Gabe von PTHrP + IBX untereinander zeigen sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede.

Ergebnisse

3.1.2 Einfluss des second messenger Inositol 1,4,5 trisphosphat (IP3) auf die Calciumfreisetzung in der glatten Muskelzelle

Wie in 3.1.1. beschrieben, kommt es unter dem Einfluss von PTHrP zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Unter der Annahme, dass das Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) der Zellen stammt, wurde der Rezeptor des Inositol 1,4,5 trisphosphat (IP3), der einen ligandenaktivierten Calciumkanal in der Membran des SR darstellt, durch den Inhibitor Xestospongin C und Xestospongin D blockiert.

Der Effekt des PTHrP wurde durch die Anwesenheit sowohl von Xestospongin C als auch von Xestospongin D signifikant reduziert.

Xestospongin C

Tabelle 2: Mittelwerte, Standardabweichungen und Fallzahlen (n) (MW \pm SD)

Zeitpunkt (in Loops)	Kontrolle (n=68)	PTHrP (n=103)	Xestospongin C (n=53)	PTHrP+ Xestospongin C
20	100	100	100	100
35	99,17 \pm 6,51	105,63 \pm 9,14	103,58 \pm 15,65	98,61 \pm 8,44
50	97,87 \pm 10,16	111,03 \pm 16,23	106,60 \pm 21,05	93,69 \pm 12,58
65	99,52 \pm 10,97	114,51 \pm 18,74	108,21 \pm 23,80	91,14 \pm 15,59
80	101,82 \pm 13,15	118,53 \pm 19,64	108,47 \pm 25,89	88,21 \pm 14,89
95	99,67 \pm 11,68	122,07 \pm 20,01	105,23 \pm 25,61	88,28 \pm 15,52
110	100,13 \pm 12,14	124,70 \pm 19,62	102,34 \pm 26,12	89,37 \pm 19,27
125	100,43 \pm 11,52	127,08 \pm 18,63	100,91 \pm 25,52	93,05 \pm 23,35
140	100,98 \pm 11,36	129,30 \pm 17,40	99,75 \pm 25,09	87,59 \pm 25,02
155	101,11 \pm 11,45	130,26 \pm 16,13	98,94 \pm 25,49	95,94 \pm 25,72

Ergebnisse

Abbildung 3:

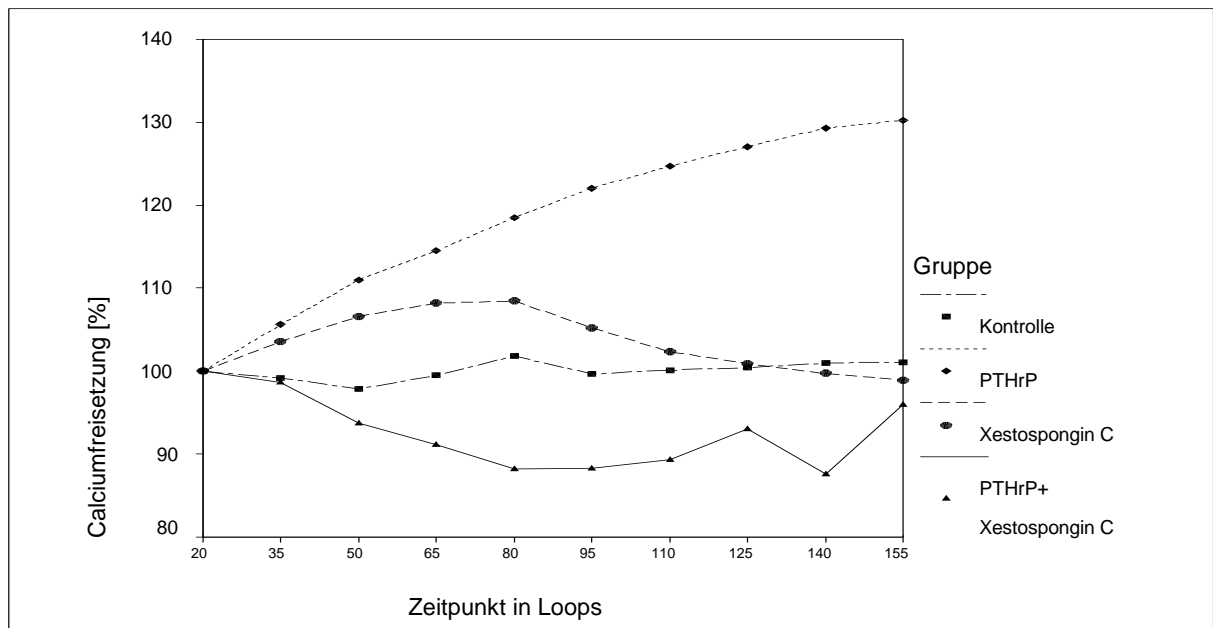


Abbildung 4:

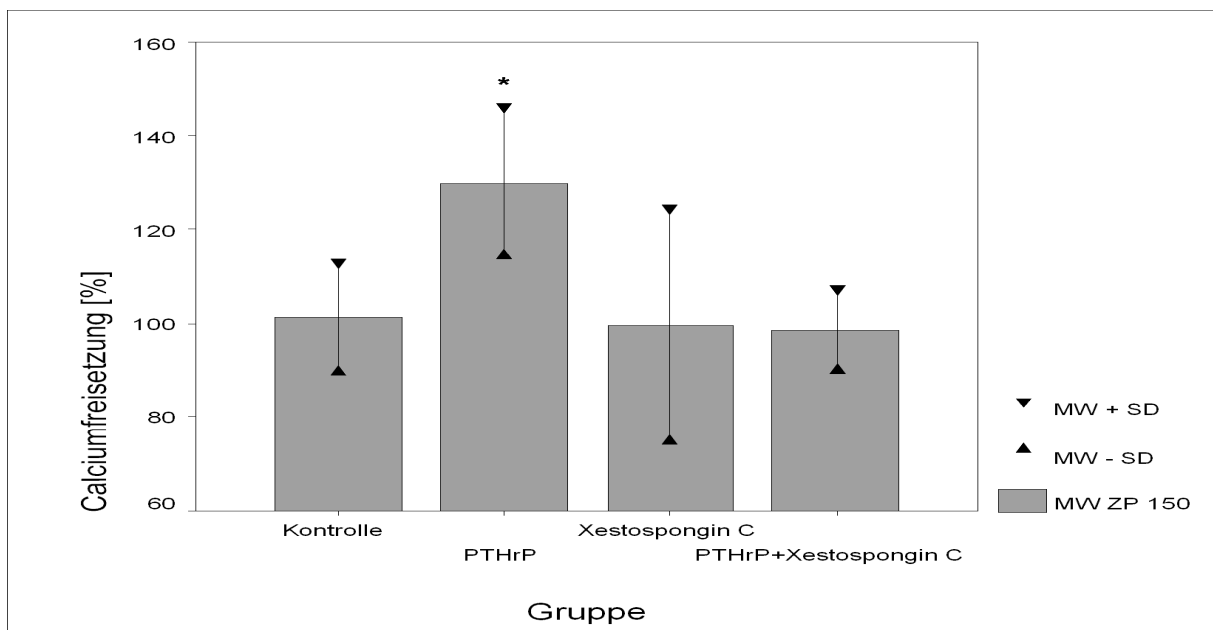


Abbildung 3 und 4: Einfluss des second messenger Inositol 1,4,5 trisphosphat (IP₃) auf die Calciumfreisetzung in der glatten Muskelzelle (MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, ZP=Zeitpunkt in Loops)

* Wert der Gruppe PTHrP signifikant unterschiedlich zu allen anderen drei Gruppen.

Ergebnisse

Ergebnisse der Messwiederholungsanalyse:

Es zeigen sich im Zeitverlauf signifikante Unterschiede zwischen der Messreihe mit PTHrP zu den drei anderen Gruppen (Kontrolle, Xestospongin C und PTHrP + Xestospongin C). Der p-Wert liegt dabei jeweils $p < 0,0005$. Bei einem Vergleich der Kontrollgruppe, Xestospongin C-Gruppe und PTHrP + Xestospongin C-Gruppe zeigen sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede.

Xestospongin D

Tabelle 3: Mittelwerte, Standardabweichungen und Fallzahlen (n) (MW \pm SD)

Zeitpunkt (in Loops)	Laborkontrolle (n=68)	PTHrP (n=103)	Xestospongin D (n=33)	PTHrP+XestosponginD (n=58)
20	100	100	100	100
35	99,17 \pm 6,51	105,63 \pm 9,14	99,63 \pm 15,28	98,54 \pm 13,79
50	97,87 \pm 10,16	111,03 \pm 16,23	102,10 \pm 29,80	92,69 \pm 17,20
65	99,52 \pm 10,97	114,51 \pm 18,74	101,98 \pm 33,62	91,35 \pm 20,20
80	101,82 \pm 13,15	118,53 \pm 19,64	103,90 \pm 36,77	90,95 \pm 20,41
95	99,67 \pm 11,68	122,07 \pm 20,01	105,69 \pm 39,05	88,40 \pm 20,33
110	100,13 \pm 12,14	124,70 \pm 19,62	104,89 \pm 38,40	88,18 \pm 21,14
125	100,43 \pm 11,52	127,08 \pm 18,63	102,79 \pm 37,68	90,17 \pm 22,60
140	100,98 \pm 11,36	129,30 \pm 17,40	100,38 \pm 38,31	90,07 \pm 23,41
155	101,11 \pm 11,45	130,26 \pm 16,13	98,24 \pm 38,36	92,21 \pm 25,18

Ergebnisse

Abbildung 5:

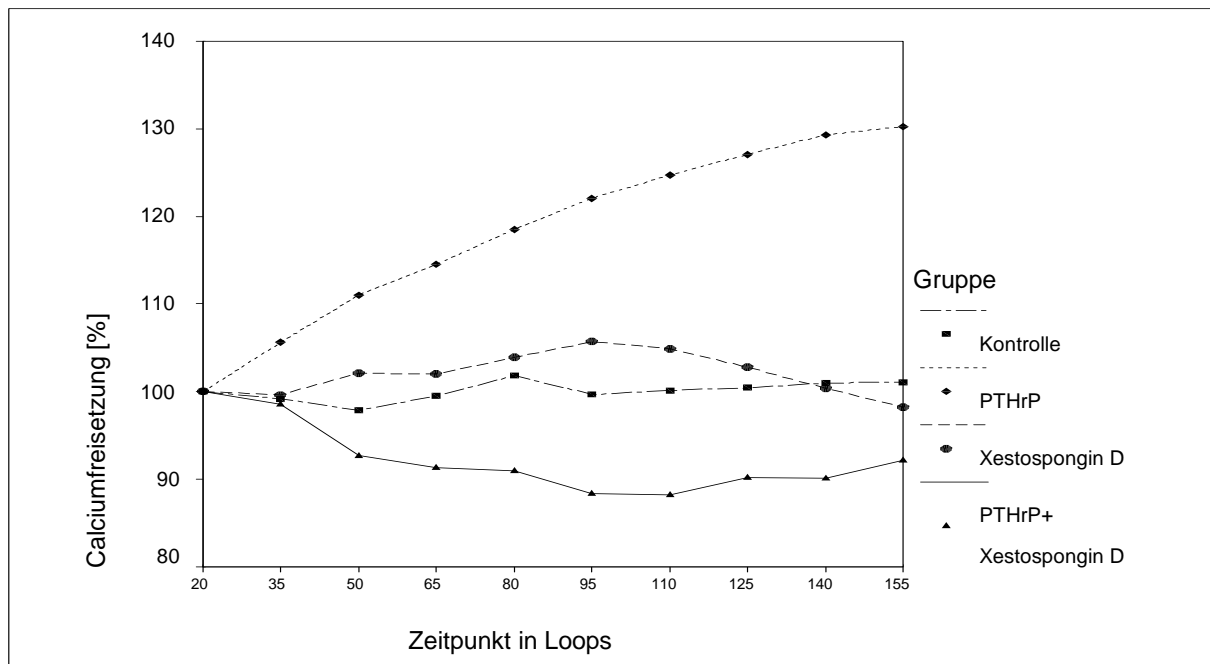


Abbildung 6:

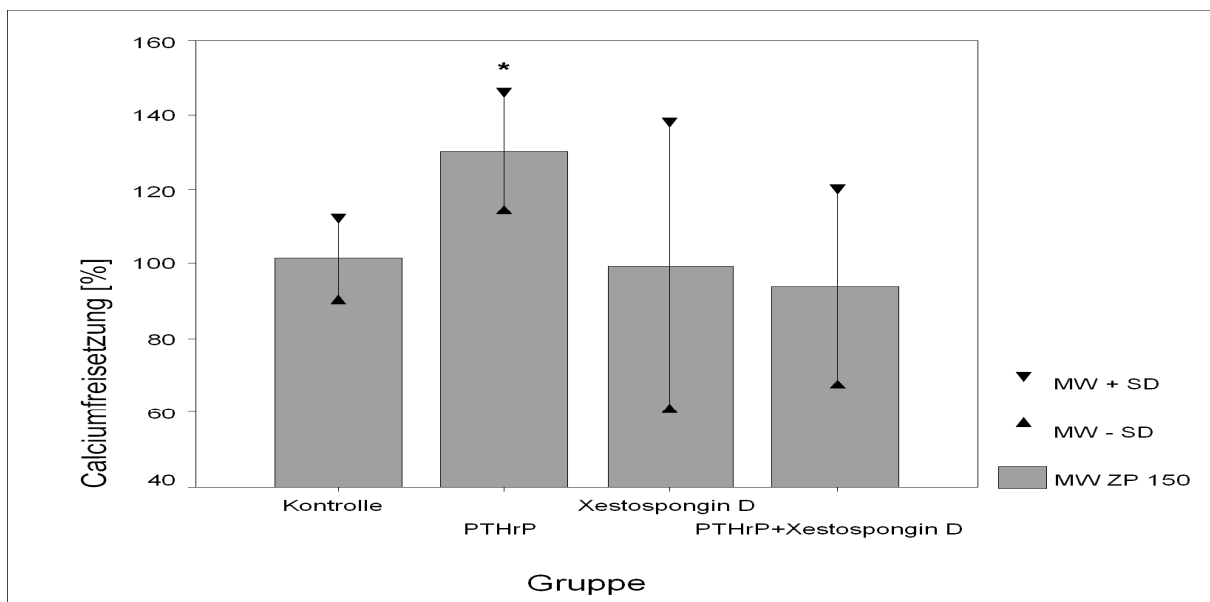


Abbildung 5+6: Einfluss des second messenger Inositol 1,4,5 trisphosphat (IP3) auf die Calciumfreisetzung in der glatten Muskelzelle (MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, ZP=Zeitpunkt in Loops)

* Wert der Gruppe PTHrP signifikant unterschiedlich zu allen anderen drei Gruppen.

Ergebnisse

Ergebnisse der Messwiederholungsanalyse:

Es zeigen sich im Zeitverlauf signifikante Unterschiede zwischen der Messreihe mit PTHrP zu den drei anderen Gruppen (Kontrolle, Xestospongin D und PTHrP + Xestospongin D). Der p-Wert liegt dabei jeweils $p < 0,0005$. Bei einem Vergleich der Kontrollgruppe, Xestospongin D-Gruppe und PTHrP + Xestospongin D-Gruppe zeigen sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede.

Ergebnisse

3.1.3 Einfluss der Calciumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums auf die Calciumhomöostase von glatten Muskelzellen

Um die Annahme aus Versuch 3.1.2 zu unterstützen, dass der durch PTHrP ausgelöste intrazelluläre Calciumanstieg mit der Freisetzung des Calciums aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) zusammenhängt, wurde in dieser Versuchsreihe die sarkoendoplasmatische Calcium-ATPase (SERCA) des SR durch Thapsigargin blockiert.

Der Effekt des PTHrP wurde durch die Anwesenheit von Thapsigargin signifikant reduziert.

Tabelle 4: Mittelwerte, Standardabweichungen und Fallzahlen (n) (MW \pm SD)

Zeitpunkt (in Loops)	Kontrolle (n=68)	PTHrP (n=103)	Tapsigargin (n=80)	PTHrP+Tapsigargin (n=31)
20	100	100	100	100
35	99,17 \pm 6,51	105,63 \pm 9,14	96,39 \pm 9,49	99,94 \pm 2,95
50	97,87 \pm 10,16	111,03 \pm 16,23	103,18 \pm 34,26	100,29 \pm 9,54
65	99,52 \pm 10,97	114,51 \pm 18,74	104,18 \pm 42,02	103,68 \pm 18,65
80	101,82 \pm 13,15	118,53 \pm 19,64	103,84 \pm 49,97	99,71 \pm 18,70
95	99,67 \pm 11,68	122,07 \pm 20,01	103,91 \pm 54,76	96,67 \pm 16,64
110	100,13 \pm 12,14	124,70 \pm 19,62	103,50 \pm 55,75	94,58 \pm 14,77
125	100,43 \pm 11,52	127,08 \pm 18,63	102,85 \pm 54,05	94,61 \pm 13,89
140	100,98 \pm 11,36	129,30 \pm 17,40	101,79 \pm 50,38	93,43 \pm 13,73
155	101,11 \pm 11,45	130,26 \pm 16,13	99,67 \pm 47,77	93,29 \pm 12,87

Ergebnisse

Abbildung 7:

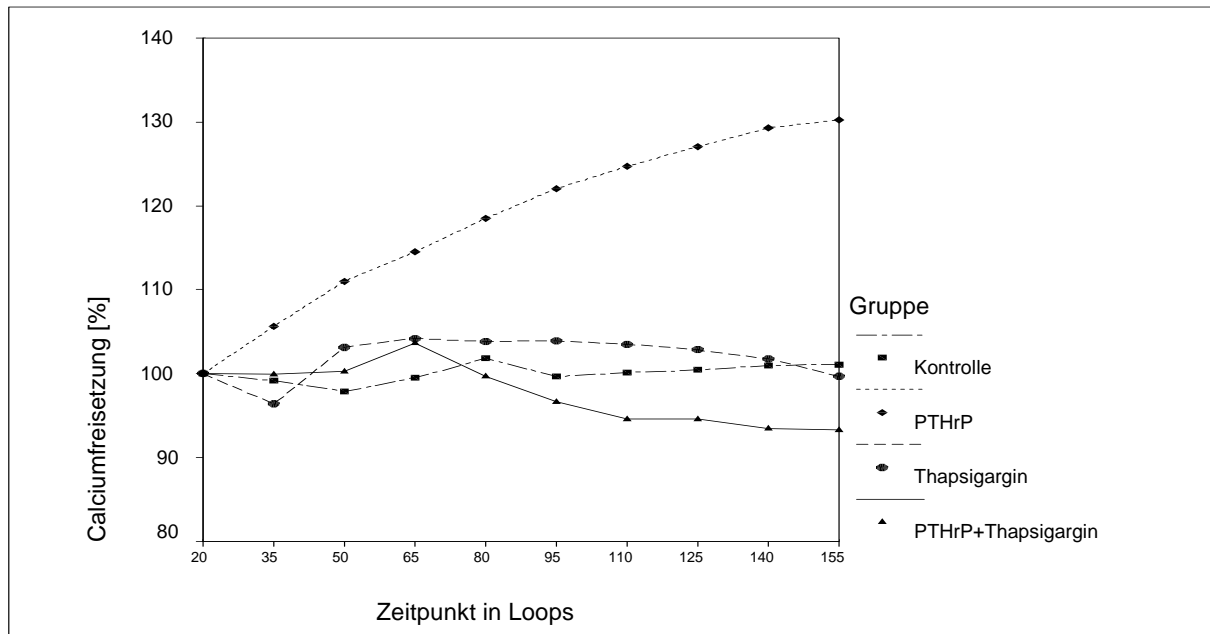


Abbildung 8:

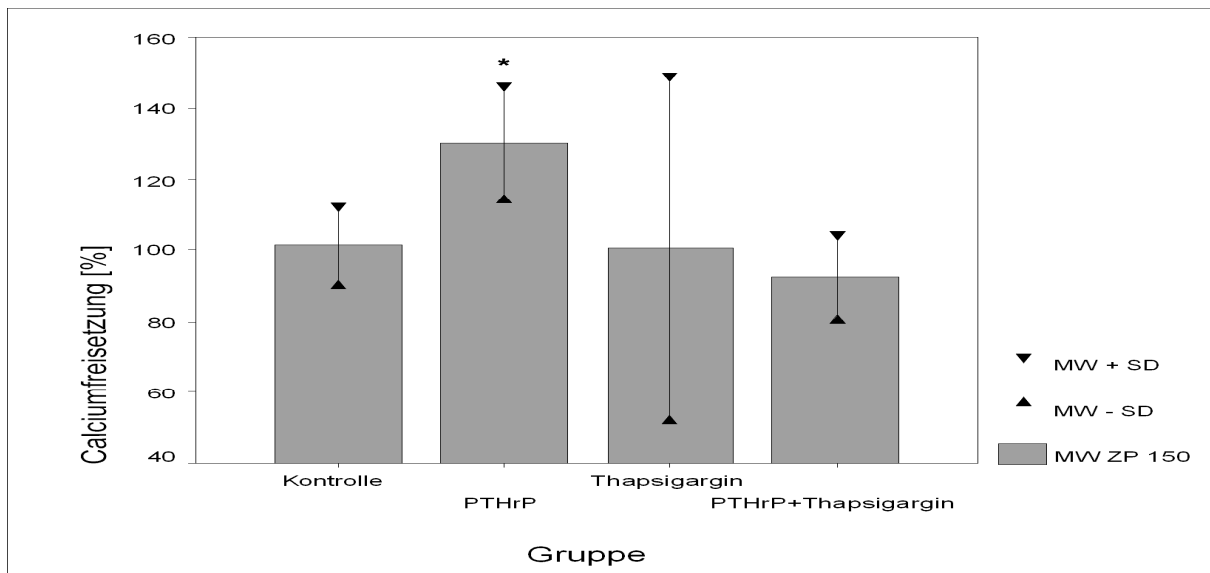


Abbildung 7 und 8: Einfluss der Calciumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums auf die Calciumfreisetzung in der glatten Muskelzelle (MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, ZP=Zeitpunkt in Loops)

* Wert der Gruppe PTHrP signifikant unterschiedlich zu allen anderen drei Gruppen.

Ergebnisse

Ergebnisse der Messwiederholungsanalyse:

Es zeigen sich im Zeitverlauf signifikante Unterschiede zwischen der Messreihe mit PTHrP zu den drei anderen Gruppen (Kontrolle, Thapsigargin und PTHrP + Thapsigargin). Der p-Wert liegt dabei jeweils $p < 0,0005$. Diese Signifikanzen sind ab Zeitpunkt $t=80$ durchgehend zu beobachten. Bei einem Vergleich der Kontrollgruppe, Thapsigargin-Gruppe und PTHrP + Thapsigargin-Gruppe zeigen sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede.

Ergebnisse

3.2 Membranpotentialmessungen

Eine Aktivierung des BK_{Ca} führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran von glatten Muskelzellen. Die Messmethodenbeschreibung erfolgte in Kapitel 2.3.2. Die Kontrollgruppe entspricht in allen Membranpotentialmessreihen 100%.

3.2.1 Membranpotentialmessung bei Inhibierung des BK_{Ca} mit Iberiotoxin

Die Aktivierung des BK_{Ca} führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran glatter Muskelzellen. Im folgenden Versuch werden die Zellen nun mit DiBAC beladen. Anschliessend wird die durch PTHrP, IBX, PTHrP und IBX induzierte Änderung des Membranpotentials gemessen. So kann aufgezeigt werden, dass die Hyperpolarisation der Zellmembran durch PTHrP über eine Aktivierung des BK_{Ca} erfolgt.

Tabelle 5: Mittelwerte, Standardabweichungen und Fallzahlen (n) (MW ± SD)

Zeitpunkt (in Minuten)	PTHrP (n=140)	PTHrP+Iberiotoxin (n=48)	Iberiotoxin (n=116)
1	99,98 ± 9,91	101,70 ± 28,02	104,77 ± 11,60
4	98,76 ± 10,08	100,96 ± 24,62	105,92 ± 10,00
7	96,06 ± 9,69	99,97 ± 21,28	105,84 ± 8,52
10	92,45 ± 9,30	97,64 ± 17,85	105,04 ± 7,87
13	88,81 ± 9,20	96,17 ± 15,13	104,00 ± 7,50
16	85,67 ± 8,72	94,28 ± 13,08	103,31 ± 7,47
19	83,21 ± 8,31	93,32 ± 11,24	103,33 ± 7,64
22	81,13 ± 7,56	91,83 ± 10,85	103,05 ± 7,71
25	79,77 ± 7,38	91,00 ± 10,09	102,91 ± 7,71
28	78,68 ± 7,18	90,99 ± 10,10	102,58 ± 7,78

Ergebnisse

Abbildung 9:

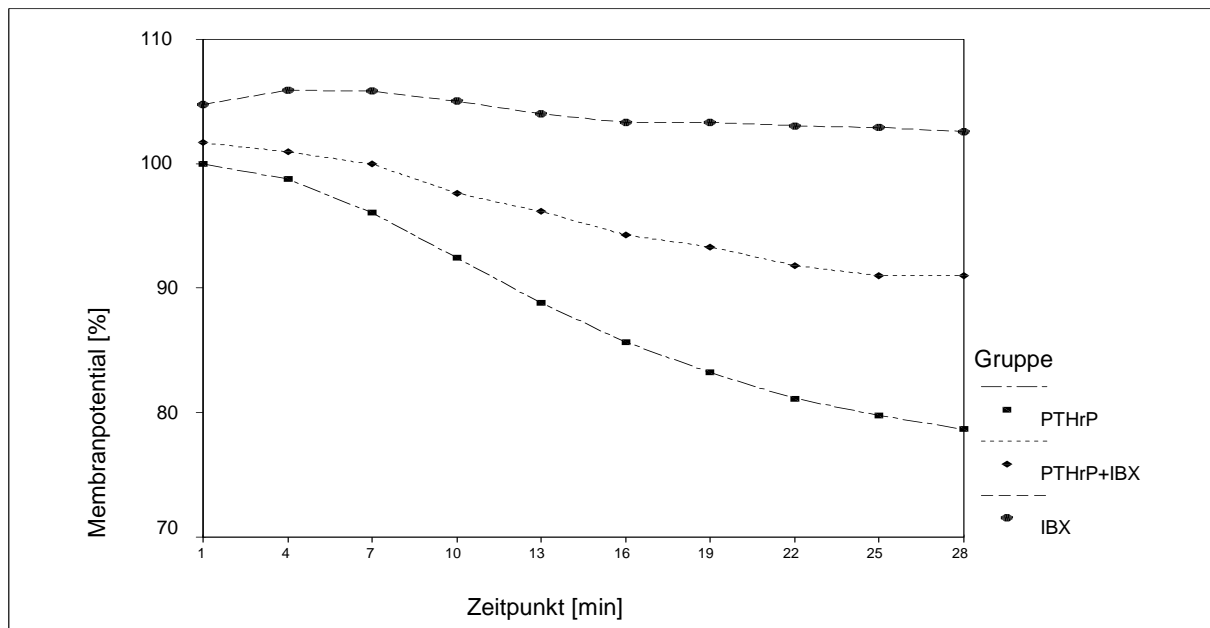


Abbildung 10:

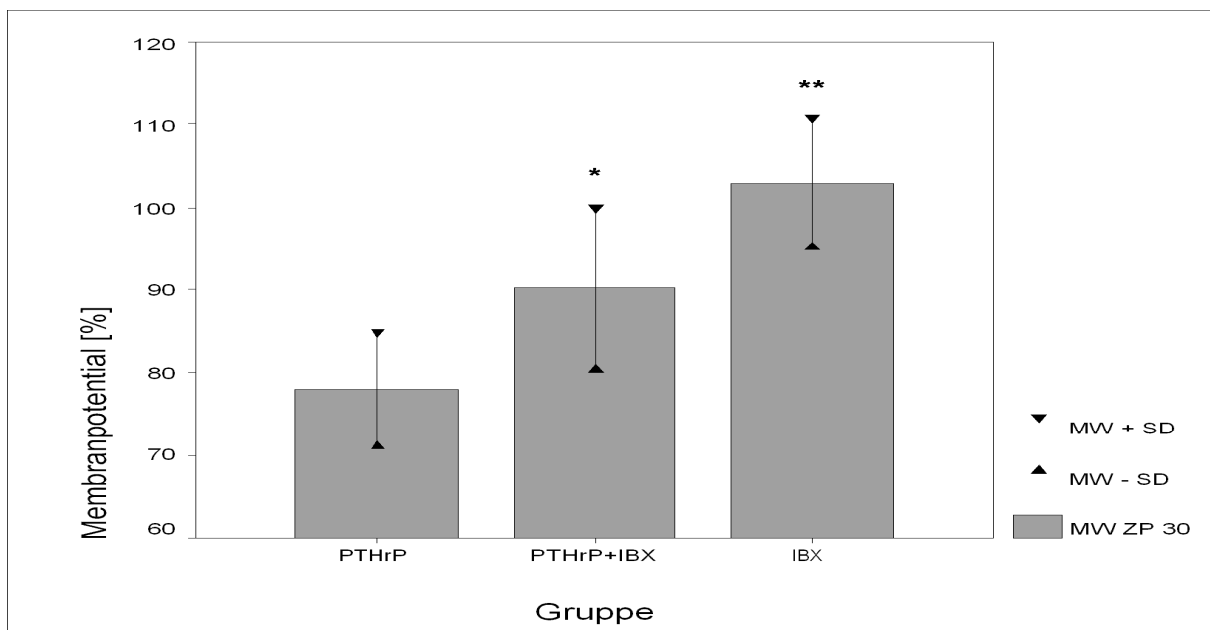


Abbildung 9 und 10: Einfluss von PTHrP auf das Membranpotential der glatten Muskelzellen in Abhängigkeit von der Aktivität des BK_{Ca} (MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, ZP=Zeitpunkt in ½ Minuten)

* Signifikant unterschiedlich zu PTHrP

** Signifikant unterschiedlich zu PTHrP und PTHrP+IBX

Ergebnisse

Gruppenunterschiede liegen über alle Zeitpunkten vor ($p < 0,0005$). Jede Gruppe kann von den anderen signifikant unterschieden werden.

Abgesehen von dem ersten Zeitpunkt liegen zu allen anderen Zeitpunkten signifikante Gruppenunterschiede vor ($p < 0,005$). Bei Zeitpunkt 4 und 7 ist Iberiotoxin signifikant unterschiedlich zu den anderen beiden Gruppen (PTHrP und PTHrP + IBX), ab Zeitpunkt 10 sind alle drei Gruppenmittelwerte signifikant unterschiedlich.

3.2.2 Abhängigkeit der durch PTHrP induzierten Hyperpolarisation des Membranpotentials glatter Muskelzellen von intrazellulärem Calcium

Um herauszufinden, ob die Hyperpolarisation durch die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration induziert wird, werden die Zellen wiederum mit DiBAC beladen. Im Folgenden wird PTHrP, der Calciumchelator BAPTA sowie PTHrP zusammen mit BAPTA hinzugegeben. Hierbei kann gezeigt werden, dass der Effekt des PTHrP durch die Anwesenheit von BAPTA signifikant vermindert wird.

Tabelle 6: Mittelwerte, Standardabweichungen und Fallzahlen (n) (MW \pm SD)

Zeitpunkt (in Minuten)	PTHrP (n=140)	BAPTA (n=143)	PTHrP+BAPTA (n=75)
1	99,98 \pm 9,91	104,26 \pm 8,59	103,12 \pm 6,72
4	98,76 \pm 10,08	106,07 \pm 8,41	105,15 \pm 7,07
7	96,06 \pm 9,69	106,07 \pm 9,12	103,45 \pm 7,39
10	92,45 \pm 9,30	105,31 \pm 9,37	100,10 \pm 7,59
13	88,81 \pm 9,20	104,41 \pm 9,37	97,10 \pm 7,31
16	85,67 \pm 8,72	104,05 \pm 9,22	94,07 \pm 6,97
19	83,21 \pm 8,31	103,81 \pm 9,03	91,92 \pm 6,86
22	81,13 \pm 7,56	103,10 \pm 8,95	89,56 \pm 6,57
25	79,77 \pm 7,38	103,08 \pm 9,20	87,88 \pm 6,41
28	78,68 \pm 7,18	102,61 \pm 8,56	86,30 \pm 6,09

Ergebnisse

Abbildung 11:

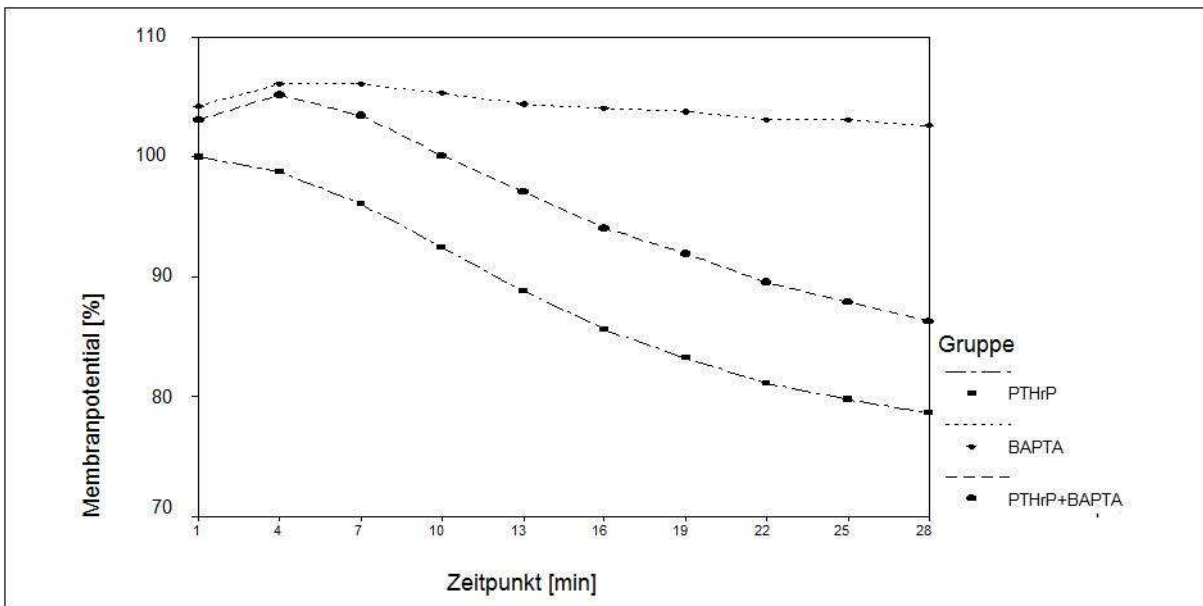


Abbildung 12:

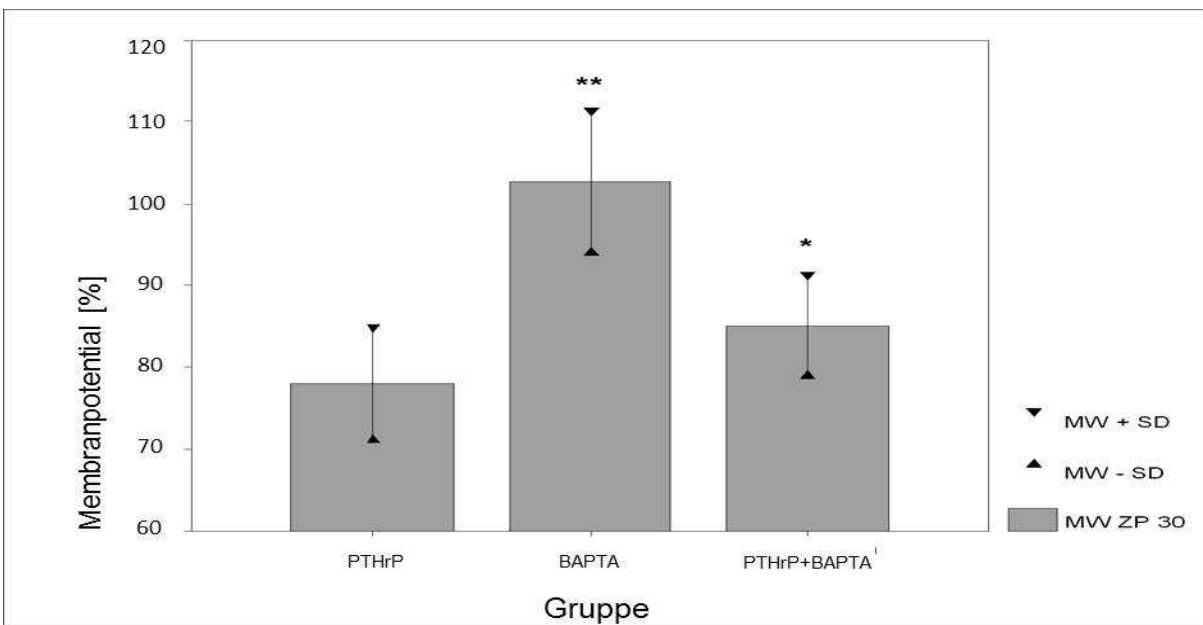


Abbildung 11 und 12: Einfluss des intrazellulären Calciums auf die Membranhyperpolarisation der glatten Muskelzellen (MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, ZP=Zeitpunkt in ½ Minuten)

* Signifikant unterschiedlich zu PTHrP

** Signifikant unterschiedlich zu PTHrP und PTHrP+BAPTA

Ergebnisse

Gruppenunterschiede zu allen Zeitpunkten vor ($p < 0,0005$). Jede Gruppe kann von den beiden anderen signifikant unterschieden werden.

Es liegen nicht parallele Verläufe der Profildigramme der drei Gruppen vor ($p < 0,0005$).

Ab Zeitpunkt 1 sind die Gruppenmittelwerte signifikant unterschiedlich. Von Zeitpunkt 1 bis 7 ist die Gruppe PTHrP zu den beiden anderen Gruppen (BAPTA und PTHrP + BAPTA), ab Zeitpunkt 10 sind alle drei Gruppen signifikant unterschiedlich zueinander.

Ergebnisse

3.2.3 Membranpotentialmessungen mit Xestospongin D

In der folgenden Versuchsreihe wird das Membranpotential von VSMC unter dem Einfluss von Xestospongin D gemessen. Durch die signifikanten Unterschiede der Messungen in Anwesenheit von Xestospongin D, dem Inhibitor des Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) Rezeptors des SR, kann somit gezeigt werden, dass das Calcium, welches für die Membranhyperpolarisation vorhanden sein muss, zu einem wesentlichen Anteil aus dem sarkoplasmatischen Retikulum der glatten Muskelzelle kommt.

Tabelle 7: Mittelwerte, Standardabweichungen und Fallzahlen (n) (MW \pm SD)

Zeitpunkt (in Minuten)	PTHrP (n=140)	PTHrP+Xestospongin D (n=24)	Xestospongin D (n=20)
1	99,98 \pm 9,91	96,73 \pm 11,04	97,01 \pm 12,41
4	98,76 \pm 10,08	98,34 \pm 11,64	99,65 \pm 13,26
7	96,06 \pm 9,69	98,45 \pm 12,32	100,51 \pm 14,14
10	92,45 \pm 9,30	98,19 \pm 12,24	100,69 \pm 13,72
13	88,81 \pm 9,20	97,04 \pm 13,22	100,39 \pm 13,94
16	85,67 \pm 8,72	95,63 \pm 13,37	99,60 \pm 14,00
19	83,21 \pm 8,31	95,04 \pm 13,27	99,96 \pm 13,91
22	81,13 \pm 7,56	93,68 \pm 13,12	99,36 \pm 14,44
25	79,77 \pm 7,38	93,75 \pm 13,21	100,59 \pm 14,79
28	78,68 \pm 7,18	93,13 \pm 12,97	99,67 \pm 14,35

Ergebnisse

Abbildung 13:

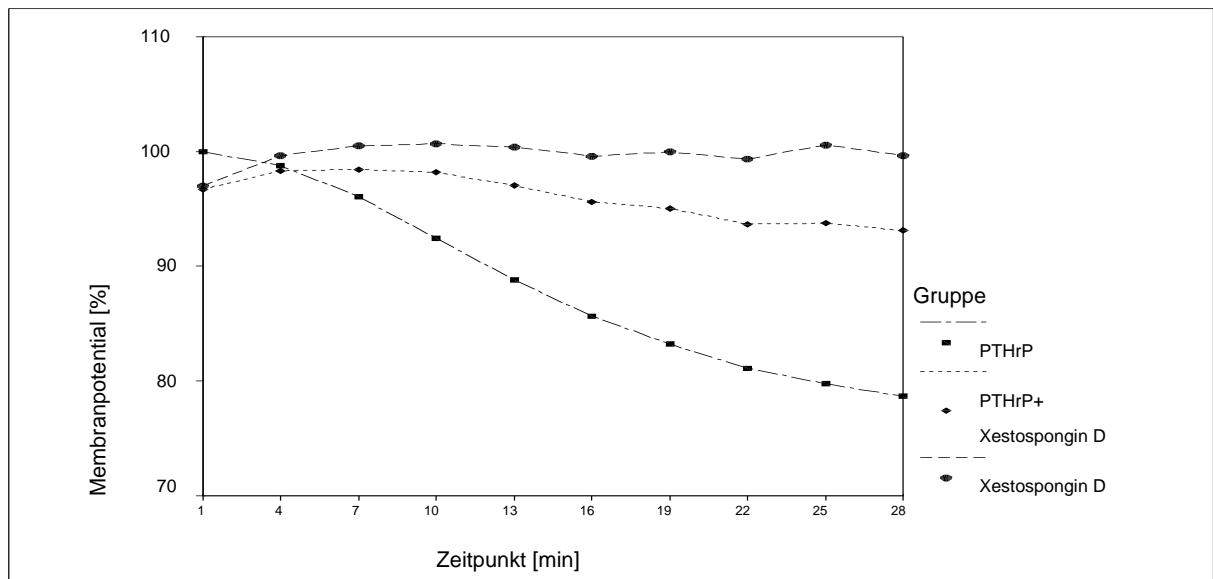


Abbildung 14:

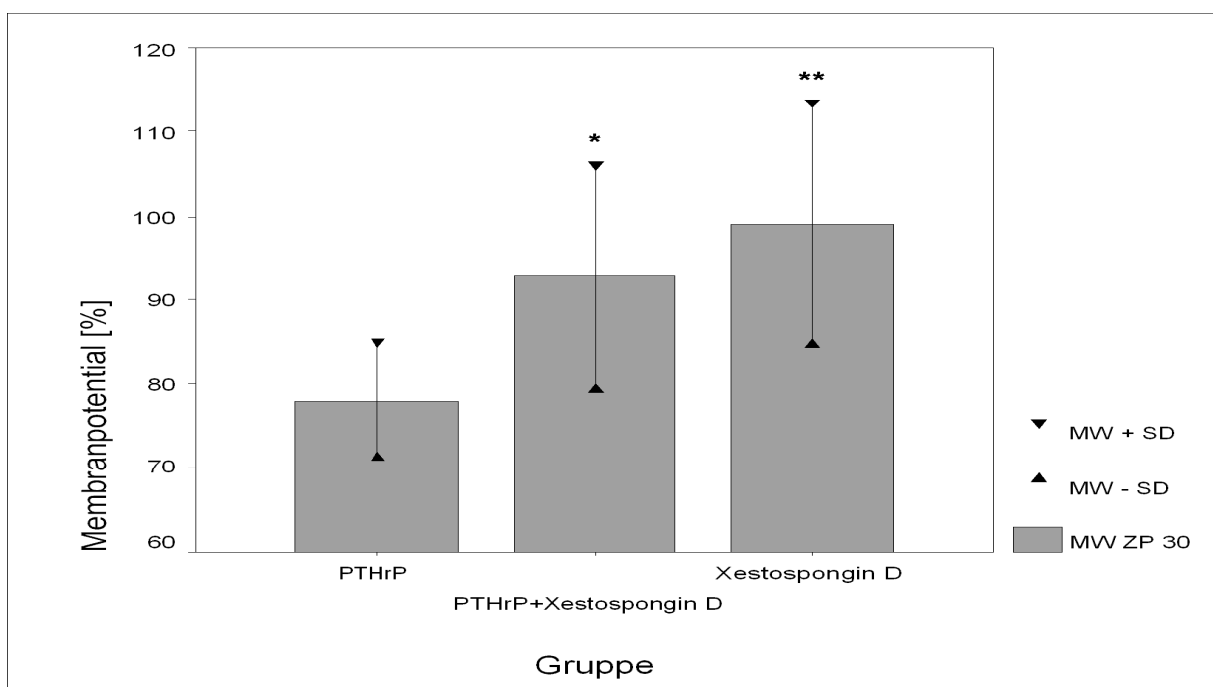


Abbildung 13 und 14: Einfluss der Inositol 1,4,5 trisphosphat (IP₃) auf die Membranhyperpolarisation der glatten Muskelzelle (MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, ZP=Zeitpunkt in ½ Minuten)

*Signifikant unterschiedlich zu PTHrP

**Signifikant unterschiedlich zu PTHrP und PTHrP+Xestospongin D

Ergebnisse

Es liegen signifikante Gruppenunterschiede zu allen Zeitpunkten vor ($p < 0,0005$). Die Gruppe PTHrP kann von den beiden anderen signifikant unterschieden werden.

Es liegen nicht parallele Verläufe der Profildigramme der drei Gruppen vor ($p < 0,0005$).

Ab Zeitpunkt 13 sind die Gruppenmittelwerte signifikant unterschiedlich. Von ZP 13 bis 19 ist die Gruppe PTHrP zu den beiden anderen Gruppen (Xestospongin D und PTHrP + Xestospongin D), ab Zeitpunkt 22 sind alle drei Gruppen signifikant unterschiedlich zueinander.

Diskussion

4. Diskussion

In diesem Kapitel werden die in Kapitel 3 präsentierten Ergebnisse interpretiert. Zunächst wird unter 4.1 ein Überblick über die Thematik PTHrP und seine Wirkung im menschlichen Organismus gegeben. Unter 4.2 erfolgt die Beschreibung der Wechselwirkung zwischen dem BK_{Ca} , der intrazellulären Calciumhomöostase und der Membranhyperpolarisation der glatten Muskelzellen unter dem Einfluss von PTHrP. In dem Kapitel 4.3 folgt eine Einschätzung der klinischen Bedeutung und eine Darstellung der experimentell herausgefundenen Signalkaskade.

4.1 PTHrP und seine Wirkung im menschlichen Organismus

Ziel dieser Arbeit ist es nachzuweisen, wie PTHrP den BK_{Ca} von glatten Muskelzellen beeinflusst und inwiefern daran die intrazelluläre Calciumkonzentration beteiligt ist. Des weiteren soll die Frage geklärt werden, ob PTHrP bei glatten Muskelzellen eine Änderung des Membranpotentials induziert, ob diese ebenfalls durch den BK_{Ca} gesteuert wird und welche Rolle dabei die intrazelluläre Calciumkonzentration spielt. Es wurde festgestellt, dass PTHrP den BK_{Ca} in glatten Muskelzellen aktiviert. Diese Ionenkanalaktivierung ist calciumabhängig. Die Beeinflussung der intrazellulären Calciumhomöostase geschieht über eine IP_3 gesteuerte Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Die Membranhyperpolarisation wird durch den BK_{Ca} vermittelt und ist dabei ebenfalls von der Calciumhomöostase der glatten Muskelzellen abhängig.

Diverse Studien haben gezeigt, dass PTHrP als ein kardiovaskulär aktives Peptid über eine Bindung an PTH-Rezeptoren arbeitet. Es spielt so, abhängig von der jeweiligen Dosis, eine grosse Rolle in der Regulation des Gefäßwiderstandes [40-43,67]. Initial gefunden wurde PTHrP jedoch durch die Eigenschaft, eine tumorinduzierte Hyperkalzaemie auszulösen [30]. Jedoch wird mittlerweile angenommen, dass es in fast jedem Zelltypus des menschlichen Körpers produziert wird. Funktionell kann dabei von drei Hauptfunktionen ausgegangen werden:

Diskussion

1. PTHrP ist ein Regulator des transepithelialen Calciumtransports, z.B. in den renaltubulären Transportmechanismen und in der Placenta [18].
2. PTHrP ist ein Regulator von beinahe jedem Gewebe in Hinblick auf Zellentwicklung, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Zelltod [40,13,46-48].
3. PTHrP ist als potenter Vasodilatator in verschiedensten Geweben bekannt, beispielsweise im Kolon, in der Harnblase, im Uterus und in Gefäßen.

Bei all diesen Prozessen ist noch weiterhin festzustellen, dass es unter mechanischem Stress zu einer deutlichen Hochregulation, zum einen der PTHrP messenger RNA (mRNA) und zum anderen von dem Peptid selber kommt [81].

Der Einfluss von PTHrP auf den BK_{Ca} von glatten Muskelzellen wurde bislang noch nicht weiter analysiert.

4.2 Wechselwirkung zwischen dem BK_{Ca} , der intrazellulären Calciumhomöostase und der Membranhyperpolarisation der glatten Muskelzellen unter dem Einfluss von PTHrP

4.2.1 BK_{Ca} in der glatten Muskelzelle

Der BK_{Ca} spielt eine entscheidende Rolle in den Signalwegen der glatten Muskelzelle. So hat er eine wichtige Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials und für die Kontrolle vom spannungsaktivierten Auswärtsstrom aus der Zelle [51]. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass PTHrP über den BK_{Ca} in glatten Muskelzellen der Rattenaorta eine Hyperpolarisation des Membranpotentials induziert, die durch Iberiotoxin, einem hochselektiven Blocker des Calcium aktivierten Kaliumkanals, signifikant gehemmt wird [21,22].

Auch durch andere Verfahren konnte schon festgestellt werden, dass eine Aktivierung des BK_{Ca} zu einer Membranhyperpolarisation von glatten Muskelzellen führt. So vermuten Garry et al., dass die Hyperpolarisation der Zellmembran durch den BK_{Ca}

Diskussion

über eine Aktivierung des NO/cGMP Weges abläuft. Die vermehrte NO Freisetzung geschieht in ihrem Modell dabei über eine druckinduzierte Vasodilatation. Ebenso wird beschrieben, dass dieser Stress auf die Gefäße zu einer vermehrten Freisetzung von Prostaglandinen führt und es dadurch zu einer cAMP/Proteinkinase A (PKA) abhängigen Stimulation des BK_{Ca} in verschiedenen Arten von glatten Muskelzellen kommt [62]. Zur Blockade und somit auch Identifikation des BK_{Ca} wird auch in dieser Studie der hochselektive Hemmstoff Iberitoxin verwendet.

Wie beschrieben, gehen Garry et al. davon aus, dass durch den Stress auf die Gefäße eine Aktivierung des BK_{Ca} ausgelöst und so die Hyperpolarisation der Zellmembran erreicht wird. Bang et al. wiederum zeigen, dass die Aktivierung des BK_{Ca} mittels Hydralazine zu einer Vasodilatation sowohl von isolierten Koronararterien, von isolierten und perfundierten Herzen als auch in der intakten Blutzirkulation von sich bei Bewußtsein befindlichen Ratten führt [60]. Auch sie verwenden Iberitoxin (0,1 µM) zur selektiven Blockade des BK_{Ca}.

Morin et al. zeigen, dass es bei glatten Muskelzellen der menschlichen Trachea unter dem Einfluss von 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) zu einer signifikanten Hyperpolarisation der Zellmembran kommt. Diese läßt sich in ihrer Studie signifikant durch den hochselektiven Hemmstoff des BK_{Ca}, Iberitoxin (10 nM), verhindern [61]. So zeigen sie durch diese Ergebnisse, dass eine Aktivierung des BK_{Ca} durch 20-HETE zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran glatter Muskelzellen der menschlichen Trachea führt und unterstützen die Annahme, dass aus einer vermehrten Öffnung des BK_{Ca} Potentialveränderungen von Zellen resultieren.

Die Effekte von PTHrP auf das Membranpotential von Zellen wurde bislang nur bei Endothelzellen, welche aus dem Rattenherz isoliert wurden, untersucht. In der Studie wurden die Endothelzellen mit PTHrP inkubiert und anschließend die Fluoreszenz mittels DiBAC imaging gemessen. Dabei haben Abdallah et al. herausgefunden, dass PTHrP eine endotheliale Membranhyperpolarisation induziert. Weiterhin zeigen sie, dass das Peptid einen von NO unabhängigen vasodilatatorischen Effekt hat, welcher mit der endothelialen Membranhyperpolarisation zusammenhängt. Diese Ergebnisse widersprechen damit der von Garry et al. herausgefundenen Kaskade, bei der die Hyperpolarisation über eine vermehrte NO-Freisetzung geschieht.

Abdallah et al. haben jedoch nicht gezeigt, ob diese Änderungen des

Diskussion

Membranpotentials mit einer Aktivierung des BK_{Ca} zusammenhängen [50].

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen so zum ersten Mal, dass PTHrP, über den BK_{Ca} vermittelt, in glatten Muskelzellen der Rattenaorta eine Hyperpolarisation des Membranpotentials hervorruft. Iberiotoxin, ein hochselektiver Blocker des Calcium aktivierten Kaliumkanals, hat diesen Effekt signifikant gehemmt. Die Hyperpolarisation der mit PTHrP stimulierten glatten Muskelzellen ist nach 15 Minuten 21,96% höher als die der Kontrollmessungen. Auch die Zellen, welche mit PTHrP und IBX stimuliert werden, weisen noch eine Zunahme der Membranhyperpolarisation von 9,77% auf. Diese trotz Inhibierung vorhandene Zunahme der Membranhyperpolarisation gegenüber der Kontrolle führt nun zu der Frage, weshalb es trotz selektiver Blockade noch zu einer Restaktivität kommt. Iberiotoxin alleine hat zu keiner signifikanten Membranpotentialänderung geführt (+2,88% vs. Kontrolle). Da das Membranpotential nicht nur von dem BK_{Ca} , sondern auch von diversen anderen Kanälen aufrecht erhalten wird, besteht die Möglichkeit, dass PTHrP über mehrere Kanäle wirkt und so Einfluss auf die Potentialaktivität von glatten Muskelzellen nimmt [51]. Durch die selektive Blockade des BK_{Ca} via Iberiotoxin wird die Aufrechterhaltung des Membranpotentials signifikant reduziert. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass eine weitere Membranpotential-Beeinflussung durch PTHrP über einen ähnlichen Kanal stattfindet. So wäre trotz Blockade des BK_{Ca} durch IBX eine vorhandene Resthyperpolarisation von 9,77% möglich.

Auch bei der Blockade des IP3-Rezeptors durch Xestospongin D wurde eine signifikante Abnahme der Membranhyperpolarisation gemessen. Die alleinige Messung mit Xestospongin D erbrachte eine nicht signifikante Membranhyperpolarisation von 0,97% vs. Kontrolle. In den mit PTHrP und Xestospongin D durchgeführten Messungen ergab sich noch eine Resthyperpolarisation von 7,19% vs. Kontrolle. Die Xestospongine XeA, XeC und XeD sind alle potente Inhibitoren des IP3-Rezeptors. Jedoch gibt es trotzdem Differenzen in ihrer Aktivität. So fanden Gafni et al. heraus, dass XeC der stärkste Inhibitor aus der Reihe der Spongine ist [65]. Durch die OH-Gruppe an Position C9 des XeD und die dadurch erhöhte Polarität postuliert die Arbeitsgruppe Xestospongin D eine 2,4-fach geringere Potenz als dem Xestospongin C. So gesehen besteht also die Möglichkeit, dass es zwar zu einer Blockade der IP3 Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums durch XeD kommt, diese aber durch eine höhere Affinität des PTHrP teilweise gebrochen werden kann und sich so eine Resthyperpolarisation von 7,19% vs. Kontrolle ergibt.

Diskussion

4.2.2 Der Calciumchelator BAPTA und die intrazelluläre Calciumhomöostase

Da es sich bei dem BK_{Ca} um einen calciumaktivierten Kaliumkanal handelt, stellt sich die Frage, ob PTHrP den Kanal direkt aktiviert oder ihn über eine Änderung der intrazellulären Calciumhomöostase beeinflusst. Um das herauszufinden, wurde in dieser Studie der Calciumchelator BAPTA eingesetzt [63]. Dabei zeigte sich eine signifikante Verminderung der durch PTHrP ausgelösten Membranhyperpolarisation der glatten Muskelzellen.

Die durch PTHrP ausgelöste Membranhyperpolarisation von 21,96% vs. Kontrolle konnte durch den Calciumchelator BAPTA auf 14,89% vs. Kontrolle signifikant gehemmt werden. BAPTA alleine hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Membranhyperpolarisation (2,06% vs. Kontrolle). Die trotz der Anwesenheit des Calciumchelators stattfindende Restmembranhyperpolarisation kann folgendermaßen zustande kommen: Die Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC vorinkubiert. Diese Inkubationslösung war BAPTA-frei. Die Zugabe der Stimulanzen sowie der Inhibitoren erfolgte erst zum Messbeginn. Robert L. Dormer beschreibt in seiner Arbeit über Calciumchelatoren, dass die Zellen vor Versuchsbeginn jeweils mindestens 30 Minuten mit dem Inhibitor inkubiert wurden [86]. Da der Wirkungsort des BAPTA intrazellulär liegt, ist es möglich, dass das Fehlen der vorherigen Inkubationszeit zu der stattgefundenen Restmembran-hyperpolarisation geführt hat.

Als Schlussfolgerung ist aus diesen Messungen zu entnehmen, dass es unter der Einwirkung von PTHrP zu einer Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration, dadurch zur Aktivierung des BK_{Ca} und infolgedessen zu einer Membranhyperpolarisation von VSMC kommen kann.

Diskussion

4.2.3 Calciumhomöostase glatter Muskelzellen und deren Beeinflussung durch PTHrP

In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen des Membranpotentials von glatten Muskelzellen unter dem Einfluss von PTHrP ist festgestellt worden, dass es zu einer Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration kommt. Deshalb wurde im Anschluss die Calciumhomöostase von VSMC unter dem Einfluss von PTHrP untersucht. Die intrazelluläre Calciumkonzentration reguliert verschiedene Zellprozesse, Enzymaktivität, Signaltransduktion, Gen-Expression, Zellproliferation, Proteinmetabolismus und die Steuerung der zellulären Muskelkontraktion. Dieses Calcium wird signifikant durch intrazelluläre Speicher im Gleichgewicht gehalten. Das sarkoplasmatische Retikulum z.B. beinhaltet grosse Vorräte an Calcium, welche bei einer Zelldepolarisation freigesetzt werden. Dabei wird die Calciumfreisetzung von zwei Mechanismen kontrolliert. Zum einen dem Inositol-trisphosphat-Rezeptor (IP3R) und zum anderen durch den Ryanodine Rezeptor (RyR) [53].

Generell führt eine Aktivierung des BK_{Ca} zu einem Ausstrom von extrazellulärem Kalium durch die Zellmembran von glatten Muskelzellen. Die Studien von Earley et al. zeigen, dass unter physiologischen Bedingungen der BK_{Ca} von glatten Muskelzellen durch Calciumfreisetzungen (Calciumsparks) über den Ryanodine Rezeptor (RyR) aktiviert wird. Diese Ryanodine Rezeptoren (RyR) befinden sich in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Die Calciumsparks stimulieren in der Nähe gelegene BK_{Ca} Kanäle und initiieren so eine Membranhyperpolarisation und eine Vasodilatation [54].

Wu et al. beschreiben, dass PTHrP keinen messbaren Effekt auf die intrazelluläre Calciumhomöostase von glatten Muskelzellen besitzt. Dies wird von ihnen bei allen VSMC Zellreihen konstant gezeigt, unabhängig von der Morphologie oder Konfluenz der Zellen und ebenso werden diese Ergebnisse nicht durch das Einsetzen verschiedener Seren beeinflusst [55]. Jedoch unterscheiden sich die Messmethoden von den in dieser Arbeit benutzten deutlich. Wu et al. führen die Messungen mit direkt vor der Messung durch Trypsin/EDTA gelösten Zellen durch.

Diese werden anschliessend in einer Salzlösung (140 mmol/l NaCl, 1 mmol/l $MgCl_2$, 4 mmol/l KCl, 0,1 mmol/l Na_2HPO_4 , 10 mmol/l HEPES/Tris, 1,5 mmol/l $CaCl_2$, 5 mmol/l

Diskussion

Glucose, 5 mmol/l Sodium Pyruvate, pH 7,4 (adjustiert mit 1M NaOH) suspendiert. Daraufhin erfolgt die Inkubation mit Fura-2-AM in einem bewegten Wasserbad (37°C) für 30 Minuten. So vorbereitet werden die Zellen erneut gewaschen und in der Salzlösung resuspendiert. Die Fluoreszenzmessung geschieht nun mittels eines Perkin-Elmer 650-40 Spektrophotometers (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) mit einer Ausgangswellenlänge von 340nm und einer Emissionswellenlänge von 500nm. Während dieser Messungen werden die Zellen kontinuierlich verwirbelt.

Anhand der Ausführungen der Messmethoden wird deutlich, dass die Zellen bei dieser Versuchsanordnung einem deutlichen Stress unmittelbar vor und während der Messung ausgesetzt sind. Auch werden stark abweichende Messmethoden, wie z.B. die im Vergleich zu der jetzigen Arbeit kurze Inkubationszeit mit Fura-2-AM von nur 30 Minuten anstatt 60 Minuten durchgeführt. Diese Faktoren können erklären, weshalb die Arbeitsgruppe Wu et al. zu so stark abweichenden Ergebnissen kommt.

Hingegen zeigen die Resultate unserer Studie eindeutig, dass der Einfluss von PTHrP eine signifikante Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt.

Diese Ergebnisse werden auch durch die Messdaten von Schubert et al. bestätigt. Sie haben die Eigenschaft des BK_{Ca} ebenfalls an glatten Muskelzellen untersucht. Sie können dabei zeigen, dass zum einen durch den BK_{Ca} die intrazelluläre Calciumhomöostase beeinflusst werden kann, zum anderen der BK_{Ca} durch eine Depolarisation aktiviert wird und diese Aktivierung zu einer Repolarisation der Zellmembran führt [62].

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen ebenfalls, dass die durch PTHrP erfolgte Calciumfreisetzung vom BK_{Ca} abhängig ist, da der Anstieg der gemessenen Calciumkonzentration signifikant durch eine Präinkubation der Zellen mit Iberiotoxin verhindert werden kann.

Auch Shenberger et al. haben schon zeigen können, dass PTHrP zu einer Aktivierung des BK_{Ca} führen kann. In ihren Untersuchungen finden sie heraus, dass die durch PTHrP erfolgte Relaxation von glatten Muskelzellen der Trachea über den PTHrP/PTH Rezeptor, eine Stimulation von cAMP (cyclic adenosine monophosphate) und ebenfalls von einer Aktivierung des BK_{Ca} abhängig ist [52].

Diskussion

4.2.4 Die Freisetzung des Calciums mittels IP3-Rezeptoren

Cai et al. haben bei ihrer Arbeit mit glatten Muskelzellen aus der Schweineaorta herausgefunden, dass über die Inositol 1,4,5 trisphosphat-Rezeptoren (IP3R) gesteuert Calcium freigesetzt wird. Weiterhin zeigen sie, dass dieser intrazelluläre Calciumanstieg calciumabhängige Kanäle aktiviert, wie z.B. den BK_{Ca} . Dieser wird also laut Studie nicht direkt von Metaboliten der IP3 aktiviert, sondern von der Calciumkonzentration dosisabhängig gesteuert [56].

Aufgrund der vielfältigen Zusammenhänge zwischen dem Einfluss von PTHrP auf die Aktivität glatter Muskelzellen, der Aktivierung des BK_{Ca} und der intrazellulären Calciumhomöostase, wurde in der jetzigen Studie nun der Frage nachgegangen, über welchen Mechanismus PTHrP die Calciumkonzentration steuert und ob ein Zusammenhang mit dem IP3R besteht. So wird im folgenden Abschnitt die Korrelation zwischen PTHrP und dem IP3 Rezeptor von VSMC näher betrachtet.

Diese Arbeit kann zeigen, dass die PTHrP induzierte Calciumfreisetzung durch die Anwesenheit von Xestospongin C und Xestospongin D, beides Inhibitoren des IP3R, signifikant gehemmt werden kann und somit unsere Annahme belegen, dass der intrazelluläre Calciumanstieg mit einer vermehrten Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum zusammenhängt.

Schon Harootunian et al. zeigen 1988, dass Calciumoszillationen von Oszillationen des IP3 abhängig sind. Jedoch benutzen sie damals Fibroblasten [64].

Oszillationen sind periodisch wiederkehrende Signalverläufe. Sie ermöglichen es, dass z.B. Calcium spezifische Signalwege durch eine unterschiedliche Intervalldauer (langperiodisch vs. Kurzperiodisch) ansprechen kann.

Die Gruppe Sneyd et al. griff diese Idee auf und untersucht den Auslösemechanismus von Calciumoszillationen an zwei weiteren Zellreihen – pankreatischen Azinus Zellen (PAC) und glatten Muskelzellen der Trachea (ASM). Dabei kommen sie zu dem Ergebnis, dass langperiodische Oszillationen in PAC von Oszillationen der IP3 abhängig sind, jedoch kurzperiodische Oszillationen in ASM dieses nicht sind. Diese Resultate deuten sie dahin gehend, dass die Produktion und der Abbau des IP3 nicht schnell genug vonstatten geht, um kurzperiodische Oszillationen hervorrufen zu können.

Diskussion

Deswegen sind nur die langperiodischen Schwankungen darstellbar.

Diese Ergebnisse können im Hinblick auf unsere Testresultate so gedeutet werden, dass es unter der Einflussnahme von PTHrP zu langfristigen Oszillationen von IP3 kommen muss, damit eine folgende Calciumausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum der glatten Muskelzellen geschehen kann. Denn diese können durch einen Hemmstoff des IP3R, Xestospongin, signifikant unterbunden werden. Kurzzeitige Calciumoszillationen laufen dementsprechend in glatten Muskelzellen der Trachea nicht über die IP3-Kaskade ab [57].

Auch White et al. haben in ihren Datenerhebungen einen Zusammenhang zwischen der Speicherung von Calcium in VSMC und dem IP3 festgestellt [58]. So werden durch die Blockierung der IP3-Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums die Calciumspeicher signifikant stärker gefüllt und die Aktivierungsschwelle erhöht. Als Hemmstoff dient der Arbeitsgruppe zum einen 2-Aminoethoxydiphenyl-Borat (2-APB; 100 M) und zum anderen Heparin (5 mg/ml).

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die Freisetzung von Calcium in glatten Muskelzellen unter anderem durch IP3 gesteuert wird. Auf unser Experiment bezogen bedeutet dieses, dass das PTHrP zu einer Aktivierung der IP3R (direkt oder indirekt) führt und es über diesen Mechanismus zu einem Calciumanstieg in VSMC kommen kann.

Auffällig ist dabei, dass es sowohl bei den Messungen von Xestospongin C + PTHrP (7,01% vs. Kontrolle) als auch Xestospongin D + PTHrP (9,59% vs. Kontrolle) zu einer Abnahme der intrazellulär gemessenen Calciumkonzentration unter das in den Kontrollmessungen festgestellte normale Calciumniveau kommt. Gafni et al. fanden heraus, dass von mehr als 120 Sponginen die Xestospongine XeA, XeC und XeD die größte Potenz haben. Ebenfalls entdeckten sie, dass die Xestospongine nicht nur über den IP3R die intrazelluläre Calciumkonzentration verringern, sondern ebenfalls über den RyR eine Abnahme der Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum bewirken [65]. So besteht die Möglichkeit, dass diese beiden Mechanismen zusammen der Grund für die geringere intrazellulär gemessene Calciumkonzentration sind.

Eine weitere Möglichkeit, die Aktivität des sarkoplasmatischen Retikulums zu verringern, besteht über eine Inhibierung der ATP abhängigen Calciumpumpe des SR mittels Tapsigargin [45]. Auch hier zeigt sich eine signifikante Hemmung der durch

Diskussion

PTHrP ausgelösten Calciumfreisetzung. Jedoch kommt es auch unter der Inhibierung durch Tapsigargin und gleichzeitiger Stimulation mit PTHrP - wie schon bei den Xestosponginen - zu einer Abnahme der intrazellulär gemessenen Calciumkonzentration (9,03% vs. Kontrolle). So sorgt das Tapsigargin nicht nur für eine Inhibierung des durch PTHrP ausgelösten Effekts, sondern scheint in seiner Wirkung so potent, dass es trotz Stimulanz die Calciumaktivität in der glatten Muskelzelle unter das in den Kontrollmessungen festgestellte reguläre Calciumniveau senkt.

4.3 Klinische Bedeutung und eine Darstellung der experimentell bestätigten Signalkaskade

Unter klinischen Gesichtspunkten lassen sich aus den erworbenen Erkenntnissen und Daten dieser und anderer Studien folgende Schlüsse zum Krankheitsgeschehen der Arteriosklerose ziehen.

In dem kardiovaskulären System führt die Anwesenheit von PTH zu einer Vasodilatation der Gefäße und hat dadurch einen hypotensiven Effekt. Diese Wirkung ist anhand des messbaren systemischen Druckes nachweisbar [66]. Jedoch ist unter physiologischen Bedingungen die PTH-Konzentration zu gering, um diesen Effekt zu bewirken. Unter dem Einfluss von PTHrP hingegen wird schon bei deutlich geringeren Konzentrationen eine Vasodilatation beobachtet [67].

Die vermehrte Expression von PTHrP kann dabei durch vasokonstriktorisch aktive Substanzen ebenso gefördert werden wie durch Wachstumsfaktoren [12]. Ebenfalls wird eine Freisetzung durch pathologische Stimuli, wie Arteriosklerose, Bluthochdruck und Restenosierung nach Angioplastien gefördert [14]. Auch Dehnung (stretch) kann zu einer vermehrten Freisetzung von dem Parathormon ähnlichen Peptid führen [31,32], welches wiederum die Zellproliferation fördert [33].

Hongo et al. haben hingegen herausgefunden, dass PTHrP die Proliferation der vaskulären Gefäßmuskelzellen verhindert. Die N-terminalen Fragmente des Peptids sollen demnach die Serum- und die PDGF (Platelet-derived growth factor)- abhängige DNA-Synthese in primären Kulturen von VSMC senken können [68]. Vermittelt werden

Diskussion

diese antiproliferativen Effekte über den PTH1-Rezeptor. Das würde bedeuten, dass PTHrP eher einen protektiven Effekt in Hinblick auf arteriosklerotische Veränderungen hat. Gestützt wird diese Theorie dabei von Ishikawa et al., die herausgefunden haben, dass PTHrP die PDGF-induzierte Migration von glatten Muskelzellen hemmt.

Ob PTHrP nun pro- oder antiproliferativ wirkt, ist also nicht eindeutig bewiesen, jedoch gilt als gesichert, dass PTHrP bei kardiovaskulären Erkrankungen, wie der Arteriosklerose, eine wichtige Rolle spielt. So konnten Ozeki et al. die vermehrte Expression von PTHrP bei diesem pathologischen Stimulus nachweisen [69].

Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse sind nun ein weiterer Schritt, die mit PTHrP verbundenen Signalkaskaden besser zu verstehen. So zeigen sie zum ersten Mal, wie es mittels PTHrP zu einer Membranhypolarisation kommt. Diese Hyperpolarisation der glatten Muskelzellmembran wiederum führt zur Inhibierung des spannungsabhängigen Calciumkanals vom L-Typ, welche eine Relaxation der Gefäßmuskulatur zur Folge hat [70]. Ebenfalls wird die Beeinflussung der intrazellulären Calciumhomöostase von VSMC durch PTHrP aufgezeigt. Im Speziellen zeigt diese Arbeit, dass die PTHrP induzierte Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über den IP3R vermittelt wird.

Im Hinblick auf die Arteriosklerose sind diese Mechanismen ein weiterer wichtiger Schritt, die einzelnen Faktoren für die Entstehung von Gefäßläsionen zu verstehen.

Abbildung 15:

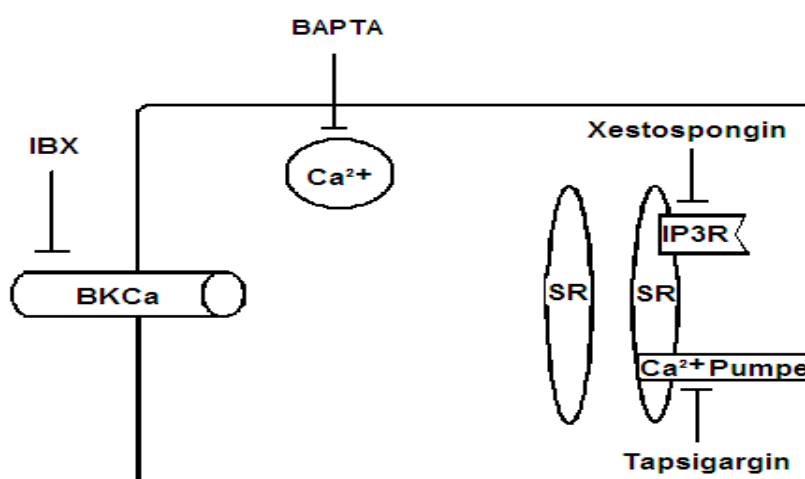


Abbildung 15: Angriffspunkte der Inhibitoren in einer schematisch dargestellten glatten Muskelzelle

Diskussion

PTHrP sorgte in den verschiedenen Versuchen für folgende Effekte:

1. Hyperpolarisation der Zellmembran glatter Muskelzellen nach 15 Minuten von 21,96% vs. Kontrolle
2. Anstieg der intrazellulär gemessenen Calciumkonzentration bei VSMC nach 15 Minuten von 28,89% vs. Kontrolle

Die durch PTHrP ausgelösten Signalwege können folgendermaßen erfolgen:

PTHrP wirkt nicht an einem, sondern an verschiedenen Orten in der glatten Muskelzelle – in diesem Versuchsaufbau sind zwei Stellen denkbar. Zum einen wirkt es direkt auf den BK_{Ca} der VSMC und sorgt so für eine Hyperpolarisation als auch für einen anschließenden Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Diese Kaskade wird signifikant durch das Skorpiongift Iberiotoxin gehemmt. Zum anderen ist ein indirekter Effekt auf den IP3R durch PTHrP wahrscheinlich, denn sowohl der dadurch ausgelöste Calciumanstieg als auch die Hyperpolarisation waren durch die Anwesenheit des Inhibitors Xestospongin hemmbar. Auch Tapsigargin hat die intrazellulär gemessene Calciumkonzentration signifikant verringert und stützt so die aufgestellte Hypothese. In Abbildung 16 ist diese Signalkaskade schematisch dargestellt.

Diskussion

Abbildung 16:

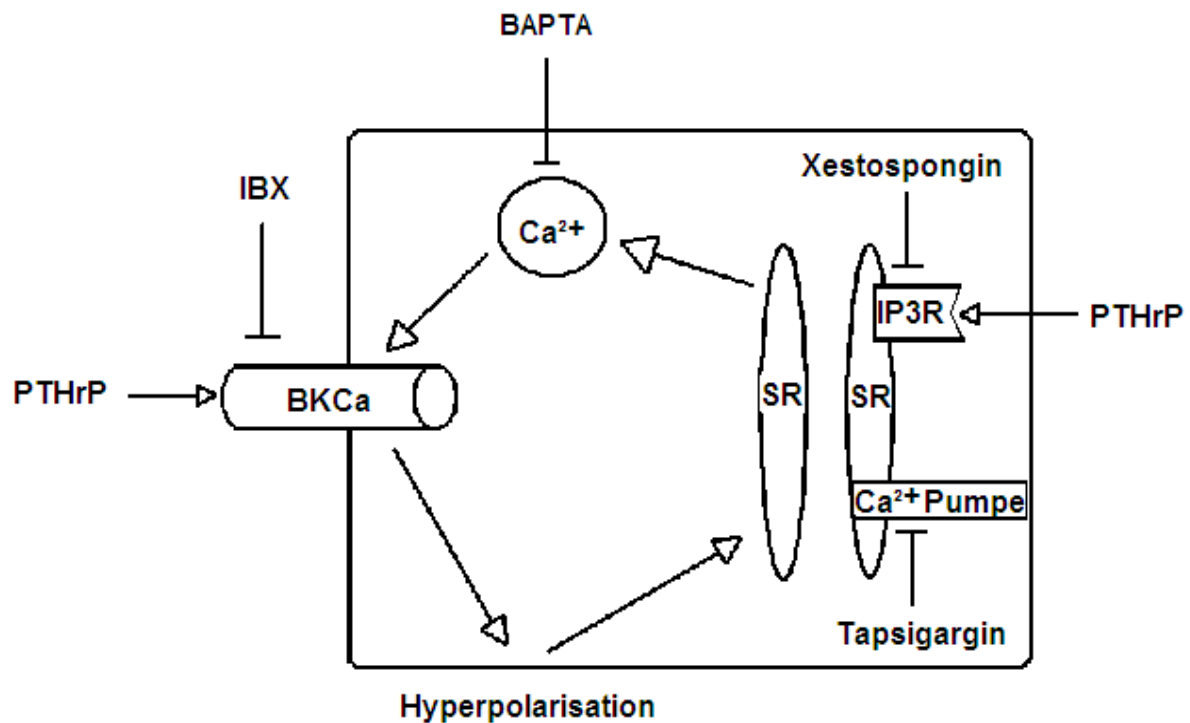


Abbildung 16: schematische Darstellung der Angriffspunkte der Inhibitoren und der durch PTHrP ausgelösten Effekte an einer glatten Muskelzelle

Ob noch andere Angriffspunkte des PTHrP vorhanden sind, bleibt offen und müsste in weiteren Versuchen geklärt werden. Die hier aufgezeigten Wege sind ein weiterer Ansatz, die Pathophysiologie der durch PTHrP hervorgerufenen Effekte an glatten Muskelzellen zu verstehen.

Zusammenfassung

5. Zusammenfassung

Das Parathormon ähnliche Peptid (PTHrP) ist ein vasodilatatorisch wirksames Peptid, welches von diversen Zellen des kardiovaskulären Systems produziert und sezerniert wird. Ziel dieser Studie ist es herauszufinden, wie PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) glatte Muskelzellen (vascular smooth muscle cells – VSMC) beeinflusst, mit besonderem Augenmerk auf die Hyperpolarisation der Zellmembran und die Calciumhomöostase.

VSMC werden aus der Rattenaorta isoliert und im weiteren Verlauf kultiviert. Membranpotentialänderungen werden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes bis-1,3-dibutylbarbituric acid-trimethine oxonol (DiBAC ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), Molecular Probes, Leiden, Niederlande) ermittelt. Durch Fura-2-acetoxymethylester (AM) ($2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) Imaging werden Veränderungen der Ca^{2+} -Freisetzung determiniert.

PTHrP ($0,01$ - $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) verursacht einen konzentrationsabhängigen Abfall der DiBAC ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) Fluoreszenz Intensität mit einem maximalen Effekt bei $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Dieser Abfall demonstriert, dass PTHrP eine Hyperpolarisation der VSMC induziert. Der Effekt kann durch die Präsenz von Iberiotoxin (100 nmol L^{-1}), einem hochselektiven Inhibitor des calciumaktivierten Kaliumkanals mit großer Leitfähigkeit (BK_{Ca}), blockiert werden. Desweiteren reduziert der Ca^{2+} -chelator BAPTA ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) die durch PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) hervorgerufene Hyperpolarisation signifikant.

Auch Xestospongin D ($6 \mu\text{mol L}^{-1}$), ein Inhibitor der IP_3 gesteuerten Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, hemmt die Membranhyperpolarisation der glatten Muskelzellen durch PTHrP signifikant.

PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) ruft ebenfalls einen Abfall des Fura-2-AM ($2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) hervor, welches ein Indikator der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist. Dieser Effekt wird ebenfalls durch Iberiotoxin (100 nmol L^{-1}) blockiert. Xestospongin C ($3 \mu\text{mol L}^{-1}$) und Xestospongin D ($6 \mu\text{mol L}^{-1}$), beides Inhibitoren der IP_3 -getriggerten Ca^{2+} Freisetzung, verhindern die Wirkung des PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Des Weiteren wird noch von Tapsigargin ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$), einem Hemmstoff der Kalziumpumpe des endo/sarkoplasmatischen Retikulums, Gebrauch gemacht.

Zusammenfassung

Thapsigargin vermindert dabei ebenfalls den Effekt des PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) signifikant.

Zusammenfassend geht aus den vorliegenden Daten hervor, dass es durch PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) mittels Aktivierung des BK_{Ca} zu einer Hyperpolarisation der VSMC kommt. Diese Ionenkanalaktivierung ist dabei Ca^{2+} -abhängig. Hinzu kommt, dass diese Aktivierung von der IP_3 -getriggerten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum beeinflusst wird.

Zusammenfassung

6. Abstract

Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) is a vasodilator peptide, produced and secreted by various cells of the cardiovascular system. Its vasorelaxing effect is independent of the presence of nitric oxide. The aim of the present study is to examine how PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) affects vascular smooth muscle cells (VSMC) with a special interest on the hyperpolarization of the membrane.

VSMC are isolated from rat aorta and further subcultured. Changes of the membrane potential are examined using the fluorescence dye bis-1.3-dibutylbarbituric acid-trimethine oxonol (DiBAC ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), Molecular Probes, Leiden, Netherlands). Fura-2-acetoxymethylester (AM) ($2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) imaging is used to determine changes in the Ca^{2+} release of the VSMC.

PTHrP ($0,01$ - $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) causes a concentration-dependent decrease of DiBAC ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) fluorescence intensity with a maximum effect at $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. This decrease demonstrates the PTHrP induced hyperpolarization of the VSMC. The effect is blocked in the presence of iberiotoxin (100 nmol L^{-1}), which is a highly selective inhibitor of large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (BK_{Ca}). Furthermore, the Ca^{2+} chelator BAPTA ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) significantly reduces PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) induced hyperpolarization.

PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) also causes a decrease of the fluorescence intensity of the indicator for intracellular Ca^{2+} : Fura-2-AM ($2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$). The effect is blocked again by iberiotoxin (100 nmol L^{-1}). Xestospongin C ($3 \mu\text{mol L}^{-1}$) and Xestospongin D ($6 \mu\text{mol L}^{-1}$), both inhibitors of the IP3-triggered Ca^{2+} release, impede the effect of PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Additionally Tapsigargin ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$), a blocker of the endo/sarcoplasmic reticulum calcium pump is used. Tapsigargin also inhibits the effect of PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$).

In conclusion, the results of the present study demonstrate that PTHrP ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) induces hyperpolarization in VSMC. It activates BK_{Ca} in VSMC. This ion channel activation is Ca^{2+} dependent. The activation is linked to the IP3-triggered Ca^{2+} release and is also dependent on the endo/sarcoplasmic reticulum calcium pump.

Zusammenfassung

Key words: smooth muscle cells, Ca^{2+} -activated K^+ channel, calcium, PTHrP, hyperpolarization

Literaturverzeichnis

7. Literaturverzeichnis

- [1] Naseem KM: The role of nitric oxide in cardiovascular diseases; Molecular Aspects of Medicine 26 (1-2): 33-65; 2005
- [2] Williams B: Mechanical influences on vascular smooth muscle cell function; Journal of Hypertension 16: 1921-1929; 1998
- [3] Davies MJ, Woolf N: Atherosclerosis - What Is It and Why Does It Occur; British Heart Journal 69: S3–S11; 1993
- [4] van der Wal AC, Becker AE: Atherosclerotic plaque rupture - pathologic basis of plaque stability and instability; Cardiovascular Research 41: 334–344; 1999
- [5] Busse R, Fichtner H, Lückhoff A, Kohlhardt M: Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells; American Journal of Physiology 255: H965-H969; 1988
- [6] Ingami T, Naruse M, Hoover R: Endothelium as an endocrine Organ; Annual Reviews in Physiology 57: 171-189; 1995
- [7] Quasching T, Ruschituka FT, Maier W, Lüscher TF: Die Rolle des Endothels bei der Entstehung und Behandlung von Gefäßkrankheiten; Internist 41: 355-362; 2000
- [8] Ross R: The Pathogenesis of Atherosclerosis – An Update; New England Journal of Medicine 314 (8): 488-500; 1986

Literaturverzeichnis

- [9] Endemann DH, Schiffrin EL: Nitric oxide, oxidative excess, and vascular complications of diabetes mellitus; *Current Hypertension Report* 6 (2): 85-9; 2004
- [10] Ross R: The Pathogenesis of Atherosclerosis: A Perspective for the 1990s; *Nature* 362: 801-809; 1993
- [11] Rudijanto A: The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis; *Acta medica Indonesiana* 39 (2): 86-93; 2007
- [12] Massfelder T, Helwig JJ: Parathyroid hormone-related protein in cardiovascular development and blood pressure regulation; *Endocrinology* 140: 1507–1510; 1999
- [13] Massfelder T, Fiaschi-Taesch N, Stewart AF, Helwig JJ: Parathyroid hormone-related peptide—A smooth muscle tone and proliferation regulatory protein; *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 7: 27–32; 1998
- [14] Massfelder T, Helwig JJ: The parathyroid hormone-related protein system: More data but more unsolved questions; *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 12: 35–42; 2003
- [15] Ackerman MJ, Clapham DE: Ion channels--basic science and clinical disease; *New England Journal of Medicine* 336: 1575-86; 1997
- [16] Beny J: Electrical coupling between smooth muscle cells and endothelial cells in pig coronary arteries; *Pflügers Archiv* 433: 364-367; 1997

Literaturverzeichnis

- [17] Schmidt, Lang, Thews: Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie; Springer Verlag, 29 Auflage 2005

- [18] W Farrugia, T de Gooyer, G E Rice, J M Moseley and M E Wlodek: Parathyroid hormone(1–34) and parathyroid hormone-related protein(1–34) stimulate calcium release from human syncytiotrophoblast basal membranes via a common receptor; Journal of Endocrinology 166: 689-695; 2000

- [19] Latorre R, Oberhauser A, Labarca P, Alvarez O: Varieties of Calcium-Activated Potassium Channels; Annual Review of Physiology 51: 385-399; 1989

- [20] Nelson MT, Quayle JM: Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle; American Journal of Physiology 268: C799-C822; 1995

- [21] Galvez A, Gemenez-Gallego G, Reube JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum R, Kaczorowski GJ, Garcia ML: Purification and Characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the High Conductance Calcium-Activated-Potassium Channel from Venom of the Scorpion *Buthus Tamulus*; Journal of Biological Chemistry 265: 11083-11090; 1993

- [22] Harvey AL, Vatanpour H, Rowan EG, Pinkasfeld S, Vita C, Menez A, Martin-Eauclaire MF: Structure-activity studies on scorpion toxins that block potassium channels; Toxicon 33 (4): 425-436; 1995

- [23] Garcia ML, Kaus HG, Munujos P, Slaughter RS, Kaczorowski GJ: Charybdotoxin and its Effects on Potassium Channels; American Journal of Physiology 269: C1-10; 1995

Literaturverzeichnis

- [24] Young JL, Libby P, Schonbeck U: Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis; *Thrombosis and Haemostasis*. 88: 554–67; 2002

- [25] Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease; *The New England Journal of Medicine* 340: 115–26; 1999

- [26] Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P: Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells; *Arteriosclerosis and Thrombosis*. 11: 1223–30; 1991

- [27] Burtis WJ, Wu T, Bunch C: Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy; *The Journal of Biological Chemistry* 262: 7151–7156; 1987

- [28] Hara M., Liu YM., Zhen L., Cohen IS, Yu H, Danilo P. Jr., Ogino K., Bilezikian JP., Rosen MR.: Positive Chronotropic Actions of Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone–Related Peptide Are Associated With Increases in the Current, I_f , and the Slope of the Pacemaker Potential; *Circulation* 96: 3704-3709; 1997

- [29] Strewler GJ, Stern PH, Jacobs JW: Parathyroid hormone-like protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone; *The Journal of Clinical Investigation* 80: 803–1807; 1987

Literaturverzeichnis

- [30] Moseley JM, Kubota M, Diefenbach-Jagger H: Medical Sciences Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line (humoral hypercalcemia); Proceedings of the National Academy of Science of the USA 84: 5048-5052; 1987
- [31] Noda M, Katoh T, Takuwa N, Kumada M, Kurokawa K, Takuwa Y: Synergistic stimulation of parathyroid hormone-related peptide gene expression by mechanical stretch and angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells; The Journal of Biological Chemistry 269: 17911–17917; 1994
- [32] Pirola CJ, Wang HM, Strgacich MI, Kamyar A, Cercek B, Forrester JS, Clemens TL, Fagin JA: Mechanical stimuli induce vascular parathyroid hormone-related protein gene expression in vivo and in vitro; Endocrinology 134: 2230–2236, 1994
- [33] Schordan E, Welsch S, Rothhut S: Role of Parathyroid Hormone–Related Protein in the Regulation of Stretch-Induced Renal Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation; Journal of the American Society of Nephrology 15: 3016–3025; 2004
- [34] Owens GK, Loeb A, Gordon D, Thompson MM: Expression of smooth muscle-specific alpha-isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation; The Journal of Cell Biology 102:343–352; 1986
- [35] Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R: The smooth muscle cell in culture; Physiological Reviews 59: 1-61; 1979

Literaturverzeichnis

- [36] Nilius B, Droogmans G: Ion channels and their functional role in vascular endothelium; *Physiological Reviews* 81: 1415-1459; 2001

- [37] Vargaas FF, Caviedas PF, Grant DS: Electrophysiological characteristics of cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells; *Microvascular Research* 47 (2): 153-165; 1994

- [38] Ledoux J et al.: Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone; *Physiology* 21:69-79; 2006

- [39] Methfessel C, Boheim G: The Gating of Single Calcium- Dependent Potassium Channels is Described by an Activation/ Blockade Mechanism; *Biophysics of Structure and Mechanism* 9: 35-60; 1982

- [40] Massfelder T, Helwig JJ, Stewart AF: Parathyroid hormone-related protein as a cardiovascular regulatory peptide; *Endocrinology* 137 (8): 3151-3; 1996

- [41] Wysolmerski JJ, Stewart AF: The Physiology of Parathyroid hormone-related Protein: An Emerging Role as a Developmental Factor; *Annual Review of Physiology* 60: 431-460; 1998

- [42] Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, Vasavada RC, Weir EC, Broadus AE, Stewart AF: Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology; *Physiological Reviews* 76:127–173; 1996

- [43] Mok LLS, Nickols GA, Thompson JC, Cooper CW: Parathyroid hormone as a smooth muscle relaxant; *Endocrine Reviews* 10: 420–436; 1989

Literaturverzeichnis

- [44] Schlüter KD, Weber M, Piper HM: Effects of PTHrP(107-111) and PTHrP(7-34) on Adult Cardiomyocytes; *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29 (11): 3057–3065; 1997

- [45] Kosterin SA, Bratkova NF, Babich LG, Shinlova OP, Slinchenko NN, Shlykov SG, Zimina BP, Rovenets NA, Velkich TA: Effect of inhibitors of energy-dependent Ca^{2+} -transporting systems on calcium pumps of a smooth muscle cell; *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal* 68 (6):50-61; 1996

- [46] De Miguel F, Fiaschi-Taesch N, Lopez-Talavera JC, Takane KK, Massfelder T, Helwig JJ, Stewart AF: The C-terminal region of PTHrP, in addition to the nuclear localization signal, is essential for the intracrine stimulation of proliferation in vascular smooth muscle cells; *Endocrinology* 142 (9): 4096-105; 2001

- [47] Clemens TL, Cormier S, Eichinger A, Endlich K, Fiaschi-Taesch N, Fischer E, Friedman PA, Karaplis AC, Massfelder T, Rossert J, et al.: Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets; *British Journal of Pharmacology* 134: 1113–1136; 2001

- [48] Massfelder T, Dann P, Wu TL, Vasavada R, Helwig JJ, Stewart AF: Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 13630–13635; 1997

- [49] Garry A, Sigaucho-Roussel D, Merzeau S, Dumont O, Saumet JL, Fromy B: Cellular mechanisms underlying cutaneous pressure-induced vasodilation: in vivo involvement of potassium channels; *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology* 289 (1): H174-80; 2005

Literaturverzeichnis

- [50] Yaser A, Günter R, Alexandra D, Heinemann MP, Schlüter K-D: N-terminal parathyroid hormone-related peptide hyperpolarizes endothelial cells and causes a reduction of the coronary resistance of the rat heart via endothelial hyperpolarization; *Peptides* 27 (11): 2927-34; 2006

- [51] Milesi V, Aiello EA, Rebolledo A, Gomez Alvis A, Grassi de Gende AO: Role of a Ca^{2+} -activated K^+ current in the maintenance of resting membrane potential of isolated, human, saphenous vein smooth muscle cells; *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 437 (3): 455-61; 1999

- [52] Shenberger JS, Shew RL, Johnson DE, Kannan MS: Relaxation of porcine tracheal smooth muscle by parathyroid hormone-related protein; *Respiration Physiology* 107 (1): 59-66; 1997

- [53] MacMillan D, Chalmers S, Muir TC, McCarron JG: IP_3 -mediated Ca^{2+} increases do not involve the ryanodine receptor, but ryanodine receptor antagonists reduce IP_3 -mediated Ca^{2+} increases in guinea-pig colonic smooth muscle cells; *The Journal of Physiology* 569 (2): 533-44; 2005

- [54] Scott E, Heppner TJ, Nelson MT, Brayden JE: TRPV4 Forms a Novel Ca^{2+} Signaling Complex With Ryanodine Receptors and BK_{Ca} Channels; *Circulation Research* 97 (12): 1270-9; 2005

- [55] Wu S, Pirola CJ, Green J, Yamaguchi DT, Okano K, Jueppner H, Forrester JS, Fagin JA, Clemens TL: Effects of N-Terminal, Midregion, and C-Terminal Parathyroid Hormone-Related Peptides on Adenosine 3',5'-Monophosphate and Cytoplasmic Free Calcium in Rat Aortic Smooth Muscle Cells and UMR-106 Osteoblast-Like Cells; *Endocrinology* 133 (6): 2437-44; 1993

Literaturverzeichnis

- [56] Cai F, Zeng XR, Yang Y, Liu ZF, Li ML, Zhou W, Pei J: Effect of IP3 on BK channels of porcine coronary artery smooth muscle cells; Sheng Li Xue Bao 57 (3): 303-9; 2005

- [57] Sneyd J, Tsaneva-Atanasova K, Reznikov V, Bai Y, Sanderson MJ, Yule DI: A method for determining the dependence of calcium oscillations on inositol trisphosphate oscillations; Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 103 (6): 1675-80; 2006

- [58] White C, McGeown JG: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors modulate Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} store content in vas deferens myocytes; American Journal of Physiology. Cell Physiology 285 (1): C195-204; 2003

- [59] Haddock RE, Hill CE: Differential activation of ion channels by inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)- and ryanodine-sensitive calcium stores in rat basilar artery vasomotion; The Journal of Physiology 545 (2): 615-27; 2002

- [60] Bang L, Nielsen-Kudsk JE, Gruhn N, Trautner S, Theilgaard SA, Olesen SP, Boesgaard S, Aldershvile J: Hydralazine-induced vasodilation involves opening of high conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels; European Journal of Pharmacology 361 (1): 43-49; 1998

- [61] Morin C, Sirois M, Echave V, Gomes MM, Rousseau E: Functional effects of 20-HETE on human bronchi: hyperpolarization and relaxation due to BK_{Ca} channel activation; American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology 293: L1037–1044; 2007

- [62] Schubert R, Nelson MT: Protein kinases: tuners of the BK_{Ca} channel in smooth muscle; Trends in Pharmacological Sciences 22: 505–512, 2001

Literaturverzeichnis

- [63] Tsien RY et al.: New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures; *Biochemistry* 19 (11): 2396-404; 1980

- [64] Harootunian AT, Kao JP, Tsien RY: Agonist-induced calcium oscillations in depolarized fibroblasts and their manipulation by photoreleased Ins(1,4,5)P₃, Ca²⁺, and Ca²⁺ buffer; *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 53: 935–943; 1988

- [65] Gafni J, Munsch JA, Lam TH, Catlin MC, Costa LG, Molinski TF, Pessah IN: Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor; *Neuron* 19: 723-733, 1997

- [66] Mok LL, Ajiwe E, Martin TJ, Thompson JC, Cooper CW: Parathyroid hormone-related protein relaxes rat gastric smooth muscle and shows cross-desensitization with parathyroid hormone; *Journal of Bone and Mineral Research* 4: 433-439; 1989

- [67] Nickols GA, Nana AD, Nickols MA, DiPette DJ, Asimakis GK: Hypotension and cardiac stimulation due to the parathyroid hormone related-peptide, humoral hypercalcemia of malignancy factor; *Endocrinology* 125 (2): 834-831; 1989

- [68] Hongo T, Kupfer J, Enomoto H, Sharifi B, Gianella-Neto D, Forrester JS, Singer FR, Goltzman D, Hendy GN, Pirola C, Fagin JA, Clemes T: Abundant expression of parathyroid hormone-related protein in primary rat aortic smooth muscle cells accompanies serum-induced proliferation; *The Journal of Clinical Investigation* 88: 1841-1847; 1991

Literaturverzeichnis

- [69] Ozeki S, Ohtsuru A, Seto S, Takeshita S, Yano H, Nakayama T, Ito M, Tokota T, Nobuyoshi M, Segre GV, Yamashita S, Yanko K: Evidence that implicates the parathyroid hormone-related peptide in vascular stenosis. Increased gene expression in the intima of injured carotid arteries and human restenotic coronary lesions; *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 16: 565-575; 1996

- [70] Hu S, Kim HS: Activation of K⁺ channel in vascular smooth muscles by cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid; *European Journal of Pharmacology* 230: 215-221; 1993

- [71] Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VL, Kronenberg HM, Mulligan RC: Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene; *Genes & Development* 8: 277-289; 1994

- [72] Reichel H, Esser A, Roth H-J, Schmidt-Gayk H: Influence of PTH assay methodology on differential diagnosis of renal bone disease; *Nephrology, Dialysis and Transplantation* 18: 759–768; 2003

- [73] Brossard JH, Yamamoto LN, D'Amour P: Parathyroid hormone metabolites in renal failure: bioactivity and clinical implications; *Seminars in Dialysis* 15 (3): 196-201; 2002

- [74] Everhart-Caye M, Inzucchi SE, Guinness-Henry J, Mitnick MA, Stewart AF: Parathyroid hormone (PTH)-related protein (1-36) is equipotent to PTH(1-34) in humans; *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81 (1):199-208; 1996

Literaturverzeichnis

- [75] Jüppner H: Receptors for Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone-related Peptide; Exploration of Their Biological Importance. Bone 25 (1): 87–90; 1999

- [76] Maggleby KL, Pallotta BS: Calcium Dependence of Open and Shut Interval Distributions from Calcium-activated Potassium Channels in Cultures Rat Muscle; Journal of Physiology 344: 585-604; 1983

- [77] Schreiber M, Salkoff L: A novel calcium sensing domain in the BK channel; Biophysical Journal 73: 1355-1363; 1997

- [78] Rian E, Jemtland R, Olstad OK, Endresen MJ, Grasser WA, Thiede MA, Henriksen T, Bucht E, Gautvik KM: Parathyroid hormone-related protein is produced by cultured endothelial cells: A possible role in angiogenesis; Biochemical and Biophysical Research Communications; 198: 740-747; 1994

- [79] Burton DW, Brandt DW, Deftos LJ: Parathyroid hormone-related protein in the cardiovascular system; Endocrinology 135 (1): 253-261; 1994

- [80] Schlüter K-D, Katzer C, Frischkopf K, Wenzel S, Taimor G, Piper HM: Expression, release and biological activity of parathyroid hormone-related peptide from coronary endothelial cells; Circulation Research 86: 946-951; 2000

- [81] Daifotis AG, Weir EC, Dreyer BE, Broadus AE: Stretch-induced parathyroid hormone-related peptide gene expression in the rat uterus; The Journal of Biological Chemistry 267: 23455-23458; 1992

Literaturverzeichnis

- [82] Pirola CJ, Wang HM, Kamyar A, Wu S, Enomoto H, Sharifi B, Forrester JS, Clemens TL, Fagin JA: Angiotensin II regulates parathyroid hormone-related protein expression in cultured rat aortic smooth muscle cells through transcriptional and post/transcriptional mechanisms; The Journal of Biological Chemistry 268: 1987-1994; 1993

- [83] Maxwell S, Delaney H: Designing experiments and analyzing data, Belmont, CA : Wadsworth; 1990

- [84] Stevens J: Applied multivariate statistics for the social science, Lawrence Erlbaum, New Jersey; 1992

- [85] MoReData GmbH, Kerkrader Strasse 11, 35394 Giessen, Deutschland

- [86] Dormer RL: Introduction of Calcium Chelators into isolated rat Pancreatic Acini inhibits Amylase Release in Response to Carbamylcholine; Biochemical and Biophysical Research Communications 119 (3): 876-883; 1984

- [87] Cribbs LL: T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: Multiple functions; Cell Calcium 40 (2006) 221–230

- [88] Kirk RE: Experimental design. 2nd ed. Monterey, Calif.: Brooks/Cole; 1982

- [89] Lonza Group Ltd; Muenchensteinerstrasse 38; CH-4002 Basel, Schweiz

Abkürzungsverzeichnis

8. Abkürzungsverzeichnis

2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl-Borat
α	alpha = Signifikanzniveau
ASM	glatte Zellen der Trachea (airway smooth muscle)
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
β	beta
BAPTA	1,2-bis (oaminophenoxy)ethane- N, N, N', N' -tetraacetic acid
BK _{Ca}	Ca ²⁺ -abhängiger K ⁺ -Kanal
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
Cl ⁻	Chlorid
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CTX	Charybdotoxin
DiBac	Bis-(1,3-dibabituric acid)-trimethine oxonole
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
Fa.	Firma
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
Fura-2-AM	Fura-2-acetoxymethylester
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution

Abkürzungsverzeichnis

HEPES	4 (2-hydroxyethyl) - acid 1-piperazineethanesulfonic
20-HETE	20-Hydroxyeicosatetraenoic acid
IBX	Iberiotoxin
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1 (insulin like growth factor-1)
IP3	Inositol 1,4,5 trisphosphat
IP3R	Inositol 1,4,5 trisphosphat Rezeptor
K ⁺	Kalium
K _{ATP}	ATP abhängige Kaliumkanäle
KCa	Calciumaktivierte Kaliumkanäle
KCl	Kaliumchlorid
K _{IR}	einwärtsgerichtete Kaliumkanäle
K _V	Spannungsabhängige Kaliumkanäle
l	liter
L	Liter
L-Typ Kanäle	large conductance and long lasting current
MgCl ²	Magnesiumchlorid
min	Minuten
μmol	micro-Mol (= 10 ⁻⁶ Mol)
mmol	milli-Mol (= 10 ⁻³ Mol)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mV	milli-Volt
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Na ² HPO ⁴	Natriummonohydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	nano-Meter (= 10 ⁻⁹ Meter)

Abkürzungsverzeichnis

nmol	nano-Mol (= 10^{-9} Mol)
NO	Stickstoffmonoxid
p	Wahrscheinlichkeit
PAC	pankreatische Azinuszellen (pancreatic acinar cells)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor (platelet derived growth factor)
PGI 2	Prostaglandin 2
PKA	Proteinkinase A
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon-ähnliches Peptid (parathyroid hormone-related peptide)
RPMI	Hydrogencarbonatpuffer (Roswell Park Memorial Institute)
RyR	Ryanodine Rezeptor
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TEA	Tetraethylammonium
TGF-alpha	Transformierender Wachstumsfaktor-alpha (transforming Growth Factor-alpha)
T-Typ Kanäle	tiny and transient
VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen (vascular smooth muscle cells)
XeA	Xestospongin A
XeC	Xestospongin C
XeD	Xestospongin

Danksagung

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben, bedanken.

Vorab möchte ich Herrn Prof. Dr. Harald Tillmanns für die Möglichkeit danken, dass ich in seiner Abteilung bzw. Arbeitsgruppe diese Doktorarbeit erstellen durfte.

Besonderen Dank möchte ich Prof. Dr. Ali Erdogan für die Auswahl der Thematik, die Bereitstellung von Laborräumen und Materialien, sowie die konstruktive Kritik bei den Berichterstattungsseminaren aussprechen.

Bei Frau Dr. Astrid Most und Dr. Christian Schaefer bedanke ich mich für die gute methodische und theoretische Betreuung und ihr immer „offenes Ohr“, auch in langen Nächten.

Herrn Prof. Dr. Dr. Piper möchte ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten des Calciumlabors danken.

Meinen Mitdoktoranden Fr. Dr. Anett Fehsecke, Dr. Sebastian Weiterer und Dr. Marc Hartmann möchte ich für die Einarbeitung in den Laboralltag und die Gerätschaften danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Pfeiffer und Frau Frey-Krug für die Unterstützung im Labor und in der Zellkultur bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Großeltern und 3 Brüdern für die großzügige Unterstützung während des Studiums, ihre immer wieder aufbauenden Worte und ihren Rückhalt in jeglicher Art.

Erklärung

10. Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5981-1



9 783835 195981 1